

Aus der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

(Direktor Prof. Dr. J. A. Auer)

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. K. Feige

**Einsatz von Interleukin-12 und Interleukin-18 kodierender Plasmid-DNA zur
Therapie von Melanomen beim Schimmel**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Patrizia Stähli

Tierärztin

von Zürich ZH

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. K. Feige, Referent

Prof. Dr. F. Ehrensperger, Korreferent

Zürich, 2005

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	3
2. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
3. LITERATURÜBERSICHT	6
3.1. Das Melanom beim Pferd	6
3.1.1. Bedeutung.....	6
3.1.2. Pathogenese	6
3.1.3. Klinisches Erscheinungsbild.....	7
3.1.4. Histologisches Erscheinungsbild.....	8
3.1.5. Therapiemöglichkeiten	9
3.2. Immunologische Grundlagen	10
3.2.1. Immunzellen.....	10
3.2.2. Zytokine.....	11
3.3. Tumorimmunologie	11
3.3.1. Tumorantigene	11
3.3.2. Immunüberwachung.....	12
3.3.3. Immun-„escape“-Mechanismen.....	13
3.3.4. „Biological response modifiers“	14
3.3.5. Die Rolle der Angiogenese.....	14
3.3.6. Interleukin-12	16
3.3.7. Interleukin-18	20
4. MATERIAL UND METHODIK.....	22
4.1. Pferde	22
4.2. Tumorlokalisation.....	22
4.3. Tiergruppen.....	23
4.3.1. Gruppe IL-12.....	23
4.3.2. Gruppe IL-18.....	23
4.3.3. Gruppe Leer.....	23
4.4. Selektion der Tumoren und Behandlungsprotokoll	23
4.5. Klinische Allgemeinuntersuchung und Blutuntersuchungen	24
4.6. Herstellung, Aufreinigung und Lagerung der Plasmid-DNA für das Leerplasmid, IL-12 und IL-18.....	25

4.7. Therapiekontrolle.....	25
4.7.1. Grössenkontrolle durch Schublehre	26
4.7.2. Sonographische Untersuchung und computerisierte Bildanalyse	26
4.8. Histologische Untersuchung der Biopsien	27
4.9. Transfektion von Melanomzellen mit pUSEr-IRES-IL-12 und pUSEr.....	28
4.10. Statistik.....	30
5. ERGEBNISSE.....	31
5.1. Klinische Allgemeinuntersuchung und Blutuntersuchung.....	31
5.2. Therapiekontrolle.....	31
5.2.1. Grössenmessung der Melanome mittels Schublehre	31
5.2.2. Grössenmessung mittels Ultraschall	33
5.2.3. Vergleich des Tumorumfanges der einzelnen Tiergruppen miteinander	34
5.2.4. Bestimmung der Vaskularisation mit Power Doppler-Sonographie	35
5.2.5. Histologische Untersuchungen der Biopsien.....	36
5.2.6. Transfektion von Melanomzellen mit IL-12 Plasmid-DNA und Leerplasmid	38
6. DISKUSSION	39
6.1. Tumoren und das Immunsystem.....	39
6.1.1. Anwendung von equiner IL-12 und IL-18-Plasmid-DNA.....	40
6.2. Veränderungen der Tumoren unter der Therapie	42
6.2.1. Einflüsse auf die Tumorgrösse.....	42
6.2.2. Einflüsse auf die Tumolvaskularisation	43
6.2.3. Einflüsse auf das Tumorgewebe	44
6.3. Nebenwirkungen	46
6.4. Schlussfolgerungen	47
7. LITERATURVERZEICHNIS	48
8. DANKSAGUNG	57
9. LEBENSLAUF	58

1. ZUSAMMENFASSUNG

Melanome machen ungefähr 3.8% aller equinen Tumoren aus. Achtzig Prozent der älteren Schimmelpopulation sind davon betroffen. Der Primärtumor befindet sich üblicherweise an der Schweifunterseite, in der Perinealregion und an den äusseren Geschlechtsorganen. Bisher empfohlene Therapiemethoden zeigten keinen zufriedenstellenden Erfolg.

In der vorliegenden klinischen Studie wurden Melanome bei 26 Schimmeln mit Leerplasmid (Kontrollgruppe), mit für Interleukin-12, respektive Interleukin-18 kodierender Plasmid-DNA intratumoral behandelt. Als Therapiekontrolle wurde das Tumolvolumen sonographisch und mit einer Schublehre gemessen. Daneben wurde die Vaskularisation des Tumors mittels Power Doppler-Sonographie bestimmt. Zusätzlich wurden Biopsien von den behandelten Tumoren entnommen und histologisch untersucht.

Die mittels Schublehre gemessenen Tumoren zeigten während des Untersuchungszeitraumes bei der Gruppe IL-18 eine signifikante Volumenabnahme und bei der Gruppe IL-12 eine Tendenz dazu. Bei 6 von 15 der mit IL-12 und IL-18 behandelten Tumoren konnte in der Kontrollbiopsie ein peritumoröses Infiltrat von Entzündungszellen festgestellt werden. Die Untersuchung der Tumoren mittels Ultraschall ergab einen Rückgang des Tumolvolumens, der jedoch statistisch nicht signifikant war.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geht hervor, dass die intratumorale Injektion von IL-18-DNA sowie IL-12-DNA einen während der Untersuchungszeit hemmenden Effekt auf das Melanomwachstum beim Schimmel hat.

SUMMARY

Equine melanomatosis is a disease of aging gray horses resulting in multiple dermal tumors, primarily involving the ventral tail, perineum and external genitalia. Approximately 80% of aging gray horses develop melanocytic tumors. So far there has been no satisfactory therapy.

In the present study 26 gray horses suffering from equine melanoma were treated intratumorally with empty plasmid-DNA (control group), interleukin-12 encoding DNA (IL-12 group) or interleukin-18 encoding DNA (IL-18 group), respectively. The success of treatment was achieved by measuring the tumor volume by ultrasound and callipers, and by evaluating the vascularization within the tumor using power doppler sonography. In addition, tumor biopsies were taken and examined histologically.

Measured by callipers, there was a statistically significant regression in tumor volume in group IL-18 and a distinct tendency to tumor regression in group IL-12. Six of 15 horses treated with IL-18-DNA or IL-12-DNA revealed peritumorous infiltration of inflammation cells in the biopsies. No significant change in size and vascularization of the treated tumors was noted by ultrasound measurement.

It was concluded that the intratumoral injection of IL-18-DNA and IL-12-DNA has the ability to inhibit tumor growth.

2. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Melanome machen ungefähr 3.8% aller equinen Tumoren aus. Besonders betroffen sind Schimmel, die mit einem Alter von über 15 Jahren zu 80% darunter leiden. Der Primärtumor befindet sich üblicherweise an der Schweifunterseite, in der Perinealregion und an den äusseren Geschlechtsorganen. Diese Tumoren können in regionale Lymphknoten und von da in innere Organe metastasieren, was lebensbedrohliche Funktionsstörungen zur Folge haben kann. Viel häufiger jedoch führen durch starke Wucherungen und expansives Wachstum der Knoten bedingte Sekundärprobleme wie Kot- oder Harnabsatzstörungen zum Tod oder zur Schlachtung betroffener Pferde. Bisher empfohlene Therapiemethoden zeigten keinen zufriedenstellenden Erfolg. Die Immunotherapie hat die Stimulation der wirtseigenen Immunantwort zum Ziel, so dass die Tumorzellen vom körpereigenen Abwehrsystem angegriffen und eliminiert werden. Diese Bekämpfung der Tumorzellen kann einerseits unspezifisch im Sinne der Erzeugung einer Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von Abwehrzellen, oder aber als spezifischer Angriff auf Tumorzellmembranantigene erfolgen. Erfolgversprechende Studien aus der Humanmedizin lieferten TumortheraPIeversuche mit Zytokinen. Man versucht damit, die Immunogenität von Tumoren zu erhöhen. Dies kann erreicht werden, indem man Gene, die für kostimulierende Moleküle oder Zytokine kodieren, direkt in die Tumorzellen zu übertragen versucht. Zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten aus der Humanmedizin ist zu entnehmen, dass die Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-18 (IL-18) eine potente Antitumorwirkung besitzen. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollen in der vorliegenden Arbeit Schimmel mit Melanomen in einer *in vivo* Studie mit für IL-12, respektive IL-18 kodierender Plasmid-DNA behandelt werden. Ziel dieser Studie ist die Erarbeitung weiterer Grundlagen zur Tumormmunotherapie und im Speziellen die Untersuchung zur Wirksamkeit sowie die Beurteilung von Nebenwirkungen von IL-12 und IL-18 beim Pferd.

3. LITERATURÜBERSICHT

3.1. Das Melanom beim Pferd

3.1.1. Bedeutung

Als melanozytische Tumoren wird eine Gruppe von Neoplasien zusammengefasst, die ihren Ursprung in den Melanozyten, den pigmentproduzierenden Zellen der Haut haben (Pulley and Stannard 1990). Melanome machen ungefähr 3.8% aller equinen Tumoren (Sundberg *et al.* 1977) und 6-15% der Hauttumoren beim Pferd aus (Ohmuro *et al.* 1993). Rund 80% der Schimmel über 15 Jahre sind, unabhängig vom Geschlecht, von diesem Hautkrebs befallen (M`Fadyean 1933). Würden die Tiere lange genug leben, wäre gemäss M`Fadyean (1933) die ganze Schimmelpopulation in hohem Alter an Melanomen erkrankt. Das Melanom wird vor allem bei Pferderassen beobachtet, bei welchen die weisse Farbe häufiger vertreten ist (z. B. Lipizzaner, Araber, Lusitanos, Andalusier). Schon seit zwei Jahrhunderten wird diese Art von Tumoren bei Pferden in der Literatur beschrieben (Valentine 1995), und schon damals fiel der hohe Anteil an erkrankten Schimmeln auf. Als Schimmel bezeichnet man Pferde, die farbig (schwarz, dunkelbraun oder fuchsfarben) zur Welt kommen und mit zunehmendem Alter mehr oder weniger rasch ergrauen, bis sie dann mit durchschnittlich 9 Jahren weiss sind (Seltenhammer 2000). Die Schimmel verfügen über eine pigmentierte Haut und dunkle Augen. Am Beispiel des Lipizzaners konnte gezeigt werden, dass bei der Beziehung zwischen Pigmentschwund und Melanomatose die familiäre Häufung eine wesentliche Rolle spielt (Gebhart and Niebauer 1977).

3.1.2. Pathogenese

Die hohe Inzidenz von Melanomen beim Schimmel wird mit der altersabhängigen Depigmentation in Zusammenhang gebracht (Rieder *et al.* 2000). Dies konnte an Lipizzanerpferden gezeigt werden, welche mit dunklem Fell zur Welt kommen. Der Ergrauungsprozess beginnt mit 2 Jahren und schreitet kontinuierlich fort bis die Pferde mit durchschnittlich 9 Jahren weiss sind. Die Haut selber bleibt dunkel. Der Pigmentverlust beginnt um die Augen und in der Perianalgegend, die wiederum die typischen Prädispositionsstellen für das Schimmelmelanom darstellen (Pulley and Stannard 1990). Die Vergrauung ist assoziiert mit dem Verlust von Melanin in den Haarfollikeln. Diese Änderung im Melaninmetabolismus wird als Stimulus für die Entstehung neuer Melanoblasten betrachtet. Diese können entweder maligne entarten

oder stimulieren ihrerseits eine Überproduktion von Melanin in der Dermis und zwar gerade an jenen Stellen, an denen das Melanom primär auftritt (Jeglum 1999). Die Melanoblasten migrieren und entwickeln sich auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort in der Haut zu Melanozyten. Ihr Hauptaktivitätssort ist der Übergang zwischen Dermis und Epidermis („Junctional Activity“). Hier geben die Melanozyten Pigment an die umliegenden Zellen ab, was die Färbung von Haut und Haar ermöglicht (Searle 1968). Auch Melanome entstehen in der Regel hier, am Hauptaktivitätssort ihrer Stammzellen (Pulley and Stannard 1990).

Beim Menschen ist bekannt, dass die UV-Strahlung ein Hauptfaktor für die Melanomentstehung darstellt (Gallagher *et al.* 1987). Im Gegensatz dazu wird davon ausgegangen, dass die Sonnenstrahlung keinen direkten Einfluss auf die Tumorgenese beim Schimmelkrebs hat, da die typische Lokalisation die Schweifunterseite ist, wo kaum Sonnenstrahlen hingelangen (Seltenhammer 2000).

3.1.3. Klinisches Erscheinungsbild

In der Literatur werden 3 klinische Erscheinungsbilder des equinen Melanoms beschrieben (Pulley and Stannard 1990). Der Grossteil der Melanome wächst langsam über viele Jahre und ohne Metastasenbildung. Eine zweite Form ist die Umbildung eines gutartigen Tumors zu einer malignen Neoplasie. Die dritte Form des Melanoms wird von Tumoren gebildet, die von Beginn an bösartig sind. Als Prädilektionsstellen für die kutanen Melanome (Primärtumoren) können die Schweifrübenunterseite, die Perinealgegend und die äusseren Geschlechtsorgane genannt werden. Auch andere reich pigmentierte Stellen wie die Lippen, die Nüstern oder die Augenlider können betroffen sein. Im Anfangsstadium handelt es sich meist um solitäre oder multiple, stechnadelkopf- bis erbsengrosse Knoten, die hauptsächlich an stark pigmentierten, haarlosen Stellen auftreten (Talukdar 1973). Dieses Anfangsstadium wird oft gar nicht erkannt. Da diese gutartig erscheinenden kleinen Knoten auch keine unmittelbare Gefahr darstellen, werden sie anfänglich kaum beachtet. Obwohl ein Grossteil dieser Melanome zu Beginn und zum Zeitpunkt der Diagnose ein gutartiges Wachstumsverhalten aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass sich mindestens 66% der Pigmenttumoren schliesslich maligne manifestieren (Gorham and Robl 1986). Im Gegensatz dazu kann anderen Literaturquellen entnommen werden, dass 95% der Melanome bei Pferden gutartig sind (Sundberg *et al.* 1977). Es ist schwierig, das Malignitätspotenzial von Melanomen bei Pferden vorauszusagen, da der histologischen

Klassifikation insgesamt keine grosse Aufmerksamkeit geschenkt wird (Foley *et al.* 1991). Da Melanome eine hohe Affinität zu Lymphgewebe haben, metastasieren sie überwiegend lymphogen und selten hämatogen (Pulley and Stannard 1990). Metastasen können lebenswichtige Organe dauerhaft schädigen und daher früher oder später zum Tod des betroffenen Tieres führen. Bekannte Zielorgane sind Milz, Niere, Leber, Körperhöhlen, Lunge, Herz oder auch Gehirn und Rückenmark. Diese Metastasierung kommt aber insgesamt sehr selten vor. Viel häufiger bewirken lokal stark entwickelte Wucherungen Sekundärprobleme, die den Tod oder die Schlachtung des Pferdes zur Folge haben (Dahme and Weiss 1999). Grosse, diffuse perianale Primärtumoren können zu erschwertem Kotabsatz führen. Grosse Metastasen im Bereich der Parotis oder der Kopflymphknoten können die Atemwege einengen oder das Zäumen des Pferdes erschweren. Als Komplikation können grosse Knoten oberflächlich ulzerieren und sich sekundär infizieren.

3.1.4. Histologisches Erscheinungsbild

Da in der Histologie zahlreiche Klassifikationen und Bezeichnungen von melanozytären Tumoren verwendet werden, kann die Nomenklatur dieser Neoplasien verwirrend sein. In der Veterinärmedizin wird im Allgemeinen nicht die in der Humanmedizin gebräuchliche Feinklassifizierung angewendet (Jeglum 1999). Es treten in der Literatur dennoch viele verschiedene Klassifikationen und Bezeichnungen für das Melanom auf. Beispiele sind Nevus, Melanosarkom, Melanozytom, Melanose und Melanomatose. Im Allgemeinen wird in der Veterinärmedizin auf histologischer Basis aber nur zwischen Melanozytomen (benignes Melanom) und malignen Melanomen unterschieden (Goldschmidt and Hendrick 2002). Melanozytome sind von unterschiedlicher Morphologie (spindelig, epitheloid, gemischt) mit verschiedenen Wachstumsmustern (flächenhaft-diffus, bündelartig, nestartig). Der Grad der Pigmentierung reicht von leicht bis sehr stark und eine gewisse Pigmentierung sowie junktionale Aktivität ist vorhanden. Die Mitoserate ist tief. Maligne Melanome beginnen beim Pferd tendenziell eher im Bereich von Haarfollikeln und Schweissdrüsen, umfassen die Epidermis und die dermoepidermale Verbindung nicht und weisen stärker polymorphe und atypische Melanozyten auf (Scott and Miller 2003). Während beim Hund unter anderem die Mitoserate zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Melanomen herangezogen wird (Goldschmidt and Hendrick 2002), ist dies beim Pferd nur von

Roels et al. (2000) beschrieben worden. Diese Autoren geben bei starker Vergrößerung einen Grenzwert von 2 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder an.

3.1.5. Therapiemöglichkeiten

Die Therapie von Pferden, die an Melanomen erkrankt sind, erweist sich allgemein als recht schwierig. Das chirurgische Entfernen von Melanomen ist möglich, wird aber nur bei kleinen und gut abgegrenzten Tumoren durchgeführt. Die ungünstige Lokalisation um das Perineum führt nach Operationen oft zu Infektionen und zu schlechter Wundheilung. Diffuses und infiltratives Wachstum in das umliegende Gewebe machen einen chirurgischen Eingriff unmöglich. Es ist kaum zu erwarten, dass Tumoren auf diese Weise vollständig entfernt werden können (Freeman 1992). Die Rezidivrate ist somit hoch. Es ist auch nicht auszuschliessen, dass durch den mechanischen Eingriff am Tumor das Risiko zur Auslösung der Metastasierung erhöht wird (Vogelnest and Müller 1993). In einer retrospektiven Studie wurde die chirurgische Exzision von Melanomen bei 11 Schimmeln allerdings erfolgreich beschrieben (Rowe and Sullins 2004). Die Kryotherapie (Kryonekrosis) stellt eine weitere Therapiemöglichkeit dar, die einerseits als ausschliessliche und andererseits in Kombination mit der Exzision eingesetzt wird (Goetz and Long 1993).

Neben chirurgischen werden auch medikamentöse Therapieversuche durchgeführt. Die Autoren Goetz und Long (1993) berichten von erfolgversprechenden Resultaten mit systemisch (oral) verabreichten Histaminantagonisten (Cimetidin). Der Effekt wird damit erklärt, dass Histaminantagonisten Suppressor-T-Zellen (die bei Tumorpatienten im Überfluss vorkommen) blockieren und somit indirekt die zelluläre und humorale Immunantwort fördern (Daniel *et al.* 1990). In klinischen Studien an Hunden mit bronchogenen Karzinomen oder malignen Melanomen konnten mit Cimetidin gute therapeutische Erfolge erzielt werden (Borgstrom *et al.* 1982). Auch intraläsional verabreichte Chemotherapeutika wurden in der Vergangenheit eingesetzt. Lokal wirkende Therapeutika weisen gegenüber den systemisch verabreichten Medikamenten eine weitaus geringere Belastung des Gesamtorganismus auf, und das Medikament kann in viel grösseren Konzentrationen direkt am Ort des Geschehens seine Wirkung entfalten. Theon und seine Mitarbeiter (1993) beschreiben die Therapie mit dem Zytostatikum Cisplatin, welches direkt intratumoral injiziert wird. Es wird dabei empfohlen, Tumoren zunächst zu exzidieren und die Tumorbasis lokal zu infiltrieren.

3.2. Immunologische Grundlagen

In der modernen Immunologie versteht man unter dem Abwehrsystem ein System verschiedenartiger Zellen, die miteinander in vielfältiger Weise in Wechselwirkung treten. Zellen interagieren miteinander mittels Mediatoren und Molekülen (Adhäsionsmoleküle), die sie auf ihrer Oberfläche tragen (Jungi 2000).

3.2.1. Immunzellen

Die Abwehrzellen gehen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark in Form einer erythroiden, myeloischen oder lymphatischen Reihe hervor (Jungi 2000). Aus der myeloischen Reihe entwickeln sich die zellulären Vermittler der unspezifischen Abwehr (Monozyten, Granulozyten), und aus der lymphatischen Reihe die Vermittler der spezifischen Abwehr (B-Lymphozyten und T-Lymphozyten). Letztere entwickeln sich weiter in Subtypen, welche an der antigenspezifischen Immunität beteiligt sind. Die unspezifische Abwehr wird von Zellen aufrechterhalten, von denen einige lebenslang vom Knochenmark in die Blutbahn abgegeben werden, andere wiederum in Gewebe einwandern und dort verbleiben. Zu diesen Zellen gehören Mastzellen, Makrophagen sowie dendritische Zellen, deren Herkunft aber nicht geklärt ist. Es handelt sich bei den letzteren um Zellen, die den T-Zellen Antigene präsentieren (Jungi 2000). Vermittler der antigenspezifischen Immunität (B- und T-Zellen) unterscheiden sich von jenen der unspezifischen Immunität dadurch, dass sie im Laufe ihrer Entwicklung antigenspezifische Rezeptoren erwerben. T-Zellen lassen sich in weitere Gruppen einteilen. CD8-T-Zellen sind zytotoxisch, d.h. sie erkennen intrazelluläre Pathogene bzw. deren intrazellulär angefallene Peptidbruchstücke, welche von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche von Wirtszellen präsentiert werden. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, die entsprechenden Zellen zu lysieren. Die CD4-T-Zellen hingegen erkennen extrazelluläre Proteinantigene, welche von Phagozyten aufgenommen und von MHC-II-Molekülen präsentiert werden. MHC-I-Moleküle kommen auf allen Zellen vor, MHC-II-Moleküle nur auf Zellen, die Antigen präsentieren können (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, Dendritische Zellen). CD4-T-Zellen haben unter anderem die Eigenschaft, dass sie ein breites Spektrum an Zytokinen sezernieren können, die wiederum andere Immunzellen beeinflussen (Jungi 2000). Die ursprünglich einheitlichen CD4-T-Lymphozyten (Th0-Zellen) differenzieren sich in 2 verschiedene Zellklone, die Typ-1 Helferzellen (Th1) und die Typ-2 Helferzellen (Th2). Diese 2 Zelltypen sind Antagonisten und unterscheiden sich vor allem bezüglich den von ihnen produzierten

Zytokinen. Das jeweils produzierte Spektrum von Zytokinen ist charakteristisch für die unterschiedliche Funktion von Th1- und Th2-Zellen, die entweder in der Förderung der Antikörperproduktion oder in der Aktivierung von Makrophagen liegt. Zytokine der Th1-Zellen fördern die Bildung weiterer Th1-Zellen und hemmen die Bildung von Th2-Zellen, während Zytokine der Th2-Zellen die Bildung weiterer Th2-Zellen fördern und die Bildung von Th1-Zellen hemmen. Vereinfacht kann gesagt werden, dass die Th1-Zellen für die Aufrechterhaltung der zellulären Antwort und die Th2-Zellen für die Aufrechterhaltung der humoralen Antwort mitverantwortlich sind (Jungi 2000).

3.2.2. Zytokine

Zytokine sind lösliche hormonartige Substanzen, die von Immunzellen und anderen Zellen in kleinsten Mengen freigesetzt werden und auf andere Zellen, die sich meist in ihrer Nähe befinden, einwirken. Zusammen mit Adhäsionsmolekülen sichern sie damit die interzelluläre Kommunikation (Jungi 2000). Zytokine haben folgende Eigenschaften:

- Bildung erst nach Aktivierung der Zelle
- Zeitlich und räumlich beschränkte Bildung und Wirkung
- Pleiotrope Wirkung (ein Zytokin hat viele Effekte)
- Redundanz (Zytokine haben dieselben oder überlappende Wirkungen)
- Kaskadenartige Wirkung (ein Zytokin induziert die Bildung eines weiteren)
- Wirkung via zytokinspezifische Rezeptoren auf den Zielzellen

3.3. Tumorimmunologie

Schon in den ersten Jahren des letzten Jahrhunderts glaubten die Wissenschaftler, dass das Immunsystem nicht nur gegen fremde Pathogene, sondern auch gegen körpereigenes neoplastisches Gewebe ankämpft. Die Immunologie der 70er und 80er Jahre war geprägt von der Hoffnung, dass die Abwehrstrategien gegen Infektionserreger auch genutzt werden können, um Tumorzellen zu eliminieren (Jungi 2000). Tierversuche haben gezeigt, dass es Immunreaktionen auf Tumorzellen gibt, und dass Tumorantigene und T-Zellen eine entscheidende Vermittlerrolle in der Tumorimmunologie spielen (Janeway and Travers 1997).

3.3.1. Tumorantigene

Tumorzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Antigene. Verschiedene Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass es sich dabei um Peptidantigene handelt, die den T-Zel-

len durch MHC-Moleküle präsentiert werden (Janeway and Travers 1997). Es gibt viele Hinweise dafür, dass praktisch bei allen Tumoren genetische Veränderungen (Mutationen, Genamplifikationen, chromosomale Deletionen oder Translokationen) vorliegen. Durch einige dieser Veränderungen wird die Expression modifizierter Proteine in den Tumorzellen verursacht. Man nimmt an, dass diese modifizierten Proteine die antigenetische Zielstruktur für die Immunantwort darstellen (Beverley 1995). Tumorantigene vermögen zwar eine Immunantwort zu induzieren, eine Schutzwirkung wird aber dadurch nicht in jedem Fall erzeugt. Auch wenn die Tumorantigene als spezifische Erkennungsstrukturen für das Abwehrsystem des Wirts oft ungenügend sind, stellen sie dennoch einen wichtigen Angriffspunkt für moderne Therapiekonzepte dar (Jungi 2000).

3.3.2. Immunüberwachung

Der Umstand, dass eine Transplantation von Tumorzellen im Empfängertier eine Antikörperbildung auslöst und die Tatsache, dass allogenes Gewebe eine starke Abwehrantwort provoziert, führte in den 70er Jahren zur Theorie der Immunüberwachung (Burnet 1970). Das Immunsystem hat eine Wächterfunktion und eliminiert Tumorzellen aufgrund ihrer Tumorantigene frühzeitig nach ihrer Entstehung, bevor sich diese extensiv teilen. Das körpereigene Abwehrsystem verfügt über verschiedene antineoplastische Wirkungen. Wenn sich die Tumorzellen in genügendem Ausmass von normalen Körperzellen unterscheiden, werden sie als fremd erkannt und angegriffen. Es zeigte sich, dass zahlreiche immunologische Effektorfunktionen zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden. Untersuchungen von menschlichen Tumoren haben gezeigt, dass die Mehrzahl von Tumoren deutlich erkennbar mit inflammatorischen Zellen infiltriert ist (Beverley 1995). Antikörper, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, vermitteln eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Die Antikörper binden an Tumorantigene und dienen als Bindeglied zwischen Tumorzelle und zytolytischer Effektorzelle. Die wichtigsten beteiligten Immunzellen zur Abwehr von neoplastischem Gewebe sind die NK-Zellen, die T-Zellen und die Makrophagen (Tizard 2000).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen eine natürliche, nicht durch Immunisation erworbene Abwehr gegen Tumoren dar, auf deren Wirkung wahrscheinlich eine natürliche Tumoresistenz beruht (Tizard 2000). Sie machen etwa 15% der peripheren Blut-Lymphozyten aus und sind dazu befähigt, Tumorzellen, virusinfizierte - und einige

normale Zellen ohne vorausgegangene Sensibilisierung zu zerstören (Tizard 2000). Untersuchungen zeigen, dass NK-Zellen im Gegensatz zu den anderen beteiligten Immunzellen selektiv diejenigen Zielzellen lysieren, welche auf ihrer Oberfläche keine MHC-I-, sondern andere Oberflächenmoleküle (MICA, CD16) exprimieren (Büttner *et al.* 1991). Die NK-Zell-medierte Zellzerstörung kommt durch Perforine und Zytotoxine zustande. Die Expression verschiedener Perforine durch NK-Zellen wird durch IL-12 gesteigert. Zudem wird durch dieses Zytokin auch die IFN- γ -Sekretion aus den NK-Zellen stimuliert, was wiederum die Entwicklung der unreifen NK-Zellen zu reifen NK-Zellen fördert (Tizard 2000).

Zytolytische T-Zellen erkennen Tumorantigene und vermögen Tumorzellen durch Zytolyse zu zerstören, sofern diese MHC-I-Moleküle exprimieren (Jungi 2000). Makrophagen wirken auf Tumorzellen zytostatisch und zytolytisch. Das Abtöten der Tumorzellen erfolgt via Induktion von Apoptose. Die wichtigsten Effektormechanismen sind vor allem die Produktion von Sauerstoffradikalen, Zytokinen und verschiedenen Enzymen (Elgert *et al.* 1998).

3.3.3. Immun-„escape“-Mechanismen

Tumoren können der Immunüberwachung auf verschiedenen Wegen entgehen. Ein Hauptgrund stellt die mangelnde Immunogenität der Tumoren dar. Auch wenn ein Tumor immunogen ist, kann er sich durch einige Mechanismen vor der Immunabwehr schützen. Anfangs hat er möglicherweise eine zu geringe Grösse, um vom Immunsystem erkannt zu werden und ist später, wenn er eine Immunantwort stimuliert, bereits zu gross für einen Abbau (Beverley 1995). Tumorzellen können dem Immunsystem aber auch durch den Verlust von Molekülen, die für eine Erkennung oder eine Adhäsion von Immunzellen wichtig sind, verborgen bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass bei einigen Tumoren wie dem Dickdarmkrebs oder dem Prostatakarzinom beim Menschen überhaupt keine MHC-I-Moleküle mehr exprimiert werden und daher eine Abwehr durch T-Zellen nicht mehr möglich ist (Janeway and Travers 1997). CD95L ist ein weiteres wichtiges Andockungsmolekül auf Tumoren wie dem Kolonadenokarzinom, dem Melanom oder dem hepatozellulären Karzinom, welches vom Tumor selbst unterdrückt werden kann, so dass es von Immunzellen nicht erkannt werden kann (Tizard 2000). Einige Tumoren haben zudem die Eigenschaft, immunsuppressive Proteine oder Zytokine zu bilden (Jungi 2000). Ein weiterer Grund für den „escape“ könnten auch „enhancing antibodies“ bilden. Das sind Antikörper, die

nicht zur Elimination, sondern zur Blockade von Erkennungsstrukturen für T-Zellen, NK-Zellen oder Makrophagen führen (Beverley 1995). All diese Gründe verhindern, dass mittels immunologischer Effektormechanismen erfolgversprechende Resultate in der Tumorbekämpfung erzielt werden können.

3.3.4. „Biological response modifiers“

„Biological Response Modifiers“ (BRMs) bilden eine Kategorie von Medikamenten gegen eine grosse Anzahl von Krankheiten wie Infektionen, Arthritiden oder Krebs. Es handelt sich dabei um synthetisch hergestellte körpereigene Substanzen wie Peptide, Blutbestandteile oder auch Zytokine, die das unspezifische Abwehrsystem stimulieren und/oder eine spezifische Immunantwort verstärken (Jungi 2000). Einerseits werden verschiedene BRMs direkt eingesetzt und andererseits werden DNA-Sequenzen hergestellt und verabreicht, die für diese Moleküle kodieren. Häufig eingesetzte BRMs sind Interleukine (IL-2, IL-10, IL12), Interferone (IFN- γ), koloniestimulierende Faktoren (CSFs) sowie der Tumornekrosefaktor (TNF). Neben den antitumoralen Eigenschaften gibt es verschiedene BRMs (z. B. Interleukin-1), die eine stark antiinflammatorische Wirkung haben und auch schon vermehrt bei Pferden mit Arthritiden mit guten Ergebnissen eingesetzt wurden (May 1989; Morris and Treadwell 1994). Als Therapeutika gegen Neoplasien wurden BRMs bei Pferden erst in einer Untersuchung eingesetzt (Heinzerling *et al.* 2001). Das in dieser Studie eingesetzte IL-12 zeigte antitumorale Eigenschaften gegen Melanome. Es gehört der Gruppe der BRMs an, da es als körpereigene Substanz die Fähigkeit besitzt, Immunzellen und somit das unspezifische Immunsystem zu induzieren (Heinzerling *et al.* 2001).

3.3.5. Die Rolle der Angiogenese

Die Bildung neuer Blutgefässe (Angiogenese) ist ein lokales, vorübergehendes physiologisches Phänomen, welches beispielsweise während der Wundheilung und bei Entzündungen auftritt. Solide Tumoren werden bis zu einer Grösse von 1-2 mm Durchmesser via passive Diffusion von benachbarten Gefässen mit Nährstoffen ernährt. Eine Angiogenese ist die Voraussetzung für ein weiteres Wachstum von Tumoren und deren Aufrechterhaltung der Nährstoffversorgung (Folkman 1995). Beim Menschen ist die Tumurvaskularisation ein wichtiges Kriterium für die Dignitätsbeurteilung und Klassifikation von Tumoren. Die meisten Studien an Mamma- sowie an Prostata- und anderen Tumoren zeigen eine positive Korrelation zwischen

der Gefässdichte im Tumor und dem Auftreten von Metastasen, einem Rezidiv oder der Überlebensrate der Patienten (Hlatky *et al.* 2002). Eine Reihe von Behandlungsmethoden wie die Strahlentherapie, die photodynamische Therapie oder die antiangiogenetische Therapie haben eine hemmende oder zerstörende Wirkung auf die Tumorgefässe und hemmen so auch das Tumorwachstum (Fingar *et al.* 1992; Wachsberger *et al.* 2003). Die Tumorgrossenmessung während und nach einer Therapie reflektiert nur einen Teil der Effizienz einer solchen Behandlungsmethode (Denis *et al.* 2003). Als Standardmethode zur Beurteilung der Tumurvaskularisation wurde bislang die histologische Untersuchung zur Bestimmung der Gefässdichte verwendet (Weidner 1995). Diese bedingt aber eine Gewebeprobenentnahme und stellt somit einen invasiven Eingriff dar. Zudem wird nur die Gefässdichte in einer bestimmten Region des Tumors widergegeben und die Resultate stehen dem Kliniker nicht direkt zur Verfügung. Die Power Doppler-Sonographie ist eine *in vivo* Methode zur Darstellung der Gefässe in Tumoren und wurde erfolgreich in der Humanmedizin zur Diagnosestellung, Dignitätsbeurteilung und Klassifikation von Tumoren eingesetzt (Beissert *et al.* 2002; Cosgrove 1999; Schroeder *et al.* 2003; William *et al.* 1998). In experimentellen Studien findet die Power Doppler-Sonographie ebenfalls Anwendung (Gee *et al.* 2001). Sie stellt ein nicht invasives, einfaches Verfahren dar, welches sich sehr gut für serielle Untersuchungen an Tumoren eignet. Dabei wird nicht nur ein Ausschnitt, sondern die gesamte Tumurvaskularisation beurteilt. Ausserdem werden dynamische Informationen über die Perfusion geliefert. Es werden jedoch nur Gefässe ab einer Grösse von etwa 100 μm dargestellt. Im Gegensatz dazu erfasst die Histologie Gefässe von einer Grösse bis etwa 15 μm (Weidner 1995). Dies bedeutet, dass beide Methoden nicht gleichgesetzt werden können, da sie verschiedene Aspekte der Tumurvaskularisation beurteilen. Die meisten Tumorzellen sowie ihre Metastasen haben die Fähigkeit, eine Angiogenese zu induzieren, indem sie angiogenetisch wirkende Zytokine und verwandte Wachstumsfaktoren abgeben (Jungi 2000). Neben einer Immuntherapie im klassischen Sinn versucht man heute, das Tumorwachstum und die Metastasierung via Einflussnahme auf die Angiogenese zu unterdrücken (Schiefer *et al.* 1999). Zu diesem Zweck werden unter anderem auch antiangiogenetische Wirkstoffe wie z. B. das Interleukin-12 (Heinzerling *et al.* 2001) oder das Interleukin-18 (Osaki *et al.* 1998) eingesetzt.

3.3.6. Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) gehört zu den Zytokinen und bildet eine wichtige Brücke zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität (Trinchieri 1995). Es handelt sich um ein Heterodimer, das aus einer α -Kette (p35 subunit) und einer β -Kette (p40 subunit) besteht und von phagozytierenden Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen gebildet wird (Colombo and Trinchieri 2002). Die Entfaltung der Aktivität von IL-12 ist rezeptorabhängig. Diese IL-12-Rezeptoren (IL-12-R) kommen auf aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vor und gehören den Typ-1 Transmembranglykoproteinen an (Gately *et al.* 1998). Durch Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung von rezeptorassoziierten Tyrosin-Kinasen. Dies hat eine Induktion eines speziellen Signalproteins zur Folge, welches wiederum im Zellkern die Transkription von Genen induziert, die für die Aktivierung von IL-12 verantwortlich sind (Akira 1999; Yamamoto *et al.* 1999). Durch diese Signalkette kommen die Effekte von IL-12 zustande, welche in erster Linie die Stimulation der Bildung und Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und die Induktion der Produktion weiterer Zytokine, insbesondere Interferon- γ (IFN- γ), darstellen. IL-12 ist daneben ein Hauptzytokin, welches für die Differenzierung von Th1 Helferzellen verantwortlich ist. Diese wiederum synthetisieren IFN- γ . Das IFN- γ seinerseits bewirkt eine starke Steigerung der Fähigkeit von Phagozyten und dendritischen Zellen IL-12 zu produzieren, so dass ein starker positiver Feedback-Mechanismus hergestellt wird (Colombo and Trinchieri 2002). IL-12 induziert also die Bildung von IFN- γ in NK-Zellen und T-Zellen, und IFN- γ wiederum bewirkt die Differenzierung von CD4-Zellen in Th1-Zellen und somit eine Immunantwort der zellulären Immunabwehr. IL-12 spielt also eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungen, der Infektionsabwehr und der Ausbildung der erworbenen Immunität (Trinchieri 1995).

3.3.6.1. IL-12 und seine Antitumor-Eigenschaften

Viele präklinische Untersuchungen an Tiermodellen haben gezeigt, dass Tumoren in Gegenwart von IL-12 in ihrem Wachstum und ihrer Metastasierung eingeschränkt werden und sogar die Überlebenszeit von Patienten verlängert werden kann. In ausgewählten Modellen kam es zur Tumorregression und Ausbildung einer Resistenz gegen weitere Tumoren. Dieser antitumorale Effekt von IL-12 konnte auch in sehr fortgeschrittenen Krebsstadien gezeigt werden (Brunda *et al.* 1996; Brunda *et al.* 1993). Interessanterweise konnten die antitumoralen Effekte von IL-12 in

Tumorzellkulturen nicht bestätigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Effekte erst im Zusammenhang mit den durch IL-12 induzierten Zellen und weiteren Zytokinen zustande kommen (Brunda *et al.* 1993). Eines dieser weiteren Zytokine ist Interferon- γ . Da Antikörper gegen IFN- γ die antitumoralen Eigenschaften von IL-12 aufheben, liegt die Vermutung nahe, dass IFN- γ an der Bekämpfung von Tumoren hauptsächlich mitbeteiligt ist (Nastala *et al.* 1994). Entsprechend dem IL-12 konnte aber bei alleiniger IFN- γ -Verabreichung in vivo keine potente Wirkung gegen Tumoren gezeigt werden. Es wird noch immer nach Begründungen gesucht, die diese Abhängigkeit von IL-12 und IFN- γ bezüglich ihrer antitumoralen Effekte erklären. Bisher wurden 4 verschiedene Mechanismen der IL-12 mediierten Antitumor-Aktivität beschrieben (Bukowski and Tannenbaum 2002). Erstens findet eine Stimulation der unspezifischen Immunität durch Aktivierung von NK-Zellen statt, wobei es sich um einen von Perforin abhängigen Mechanismus handelt (Smyth *et al.* 2000). Zweitens wird auch die spezifische Immunität über die Induktion einer Th1-Immunantwort und die Ausbildung zytotoxischer T-Lymphozyten stimuliert (Tannenbaum *et al.* 1996).

IFN- γ fördert die Ausschüttung von chemotaktischen Stoffen, welche NK-Zellen und aktivierte T-Zellen anlocken. Es kommt dabei auch zu einem Zustrom von CD4- und CD8-T-Lymphozyten, welche wiederum in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören (Tannenbaum *et al.* 1996). Verschiedene Versuche festigen diese Theorie der verstärkten zellulären Immunität. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Antikörper gegen die chemotaktischen Stoffe die antitumorale Wirkung aufheben (Bukowski *et al.* 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen ohne CD8-T-Zellen die Tumoren nicht auf IL-12 ansprechen, wohingegen Mäuse mit CD8-T-Zellen auf die Therapie reagieren (Brunda *et al.* 1993). Weiter konnte gezeigt werden, dass es nach der Behandlung mit IL-12 zu einer massiven Makrophageninfiltration in das Tumorgewebe kommt (Ha *et al.* 1998; Heinzerling *et al.* 2002; Tannenbaum *et al.* 1996). Ein dritter biologischer Effekt von IL-12 ist die Steigerung der Immunogenität von Tumoren durch vermehrte Antigen-Expression auf der Tumorzelloberfläche (Heinzerling *et al.* 2002). Den vierten wichtigen Antitumor-Effekt bildet die Induktion von antiangiogenetischen Faktoren durch IL-12 induziertes IFN- γ (Kerbel and Hawley 1995; Sgadari *et al.* 1996). Wachsende Tumoren sind für ihre Ernährung, Expansion und Metastasierung dauernd auf eine Neovaskularisation angewiesen. IL-12 und IFN- γ haben die Eigenschaft, dass sie Tumorzellen selber anregen können, antiangiogenetische Chemokine zu bilden. Eine Studie, die an Mäusen mit Melanomen

durchgeführt wurde zeigte, dass die Behandlung mit IL-12 zu einer ischämiebedingten Hypoxie und dadurch zur Apoptose im Tumor führt (Gee *et al.* 1999). Der genaue Mechanismus der Antiangiogenese ist unklar, es konnte aber gezeigt werden, dass kleinste Konzentrationen von Chemokinen die Endothelzellproliferation (Luster *et al.* 1995) und die Differenzierung in gefässartige Strukturen hemmen (Sgadari *et al.* 1996). Der antiangiogenetische Effekt betrifft nicht nur die Gefässneubildung, sondern auch bereits existierende Gefässe (Heinzerling *et al.* 2002).

3.3.6.2. Der präklinische und klinische Einsatz von IL-12

Vielversprechende Daten aus *in vitro* Studien und präklinischen Versuchen machen IL-12 zu einem grossen Hoffnungsträger in der Krebstherapie. Aufgrund der erfolgversprechenden antitumoralen Effekte von IL-12 aus Versuchen an Tiermodellen hat man vor rund 10 Jahren begonnen, klinische Versuche durchzuführen. Zuerst wurden Studien über die Toxizität, Pharmakokinetik und Ermittlung des MTD-Wertes bei intravenöser Applikation von IL-12 durchgeführt (Atkins *et al.* 1997). Die Nebenwirkungen bestanden aus Fieber, Müdigkeit, Nausea und Kopfschmerzen. Zudem zeigten sich auch hämatologische und blutchemische Veränderungen wie Anämie, Panzytopenie, Hyperglykämie und Hypoalbuminämie (Atkins *et al.* 1997). Die subkutane Verabreichung von IL-12 ist mit wesentlich geringeren toxischen Nebenwirkungen verbunden (Colombo and Trinchieri 2002). Atkins *et al.* (1997) haben 12 Patienten mit metastasierenden Melanomen in einer Phase-I-Studie intravenös mit IL-12 behandelt. Bei einem Patienten mit Metastasen in der Pleura und Infiltraten in Lymphknoten kam es zu einer kurzfristigen starken Regression der Metastasen. Ein weiteres Projekt wurde von Bajetta *et al.* (1998) an 10 unter Melanomen leidenden Menschen durchgeführt. Dabei wurde IL-12 subkutan verabreicht. Drei der 10 behandelten Patienten zeigten eine deutliche Tumorregression. Aus diversen Studien konnte man den Schluss ziehen, dass die therapeutischen Effekte von IL-12 mit einer zunehmenden Dosierung stärker sind (Brunda *et al.* 1993; Colombo *et al.* 1996). Dem gegenüber steht eine dosisabhängige Zunahme der toxischen Nebenwirkungen (Motzer *et al.* 1998). In einem Phase-I-Versuch von Motzer *et al.* (1998) wurde rekombinantes IL-12 alle 3 Wochen in zunehmender Dosierung (0.1, 0.5, 1.0 µg/kg) subkutan injiziert. Ab der zweiten Dosis zeigten sich Nebenwirkungen wie Fieber, Müdigkeit, Erbrechen, Husten, Mukositis und Leukopenie. Es liegt nahe, dass durch Steigerung der Zytokindosis grössere Antitumoreffekte erreicht werden könnten

(Colombo *et al.* 1996). Genau hier liegt jedoch die Schwierigkeit. Die dosisabhängige Toxizität erfordert somit ein genaues Überprüfen verschiedener Therapieprotokolle.

3.3.6.3. IL-12 in der Tumor-Gentherapie

Die somatische Gentherapie ist eine Behandlungsform, welche Gene in Zellen ausserhalb des Reproduktionssystems bringt. Gerade Hauttumoren bilden durch die gute Zugänglichkeit optimale Lokalisationen, um diese Therapieform anzuwenden. Da die Haut eine sehr ausgeprägte immunologische Aktivität besitzt, ist die Anwendung von für Zytokine wie IL-12 kodierenden Genen ein interessanter Therapieansatz (Tahara *et al.* 1995). Gründe, warum man auf die Gentherapie ausweicht, sind einerseits die sehr kurze Plasmahalbwertszeit von direkt verabreichtem IL-12 und anderen beteiligten Zytokinen und andererseits deren hohe Toxizität bei hohen systemischen Peak-Konzentrationen (Keilholz *et al.* 1998; Tahara *et al.* 1995). Lokal hohe Zytokinkonzentrationen sind essentiell für einen Antitumoreffekt (Colombo *et al.* 1996). Physiologisch wirken Zytokine in sehr geringen Konzentrationen und auf sehr geringe Distanzen (Rosenberg *et al.* 1989). Es liegt also nahe, die lokale Konzentration der interessierenden Zytokine am Tumor dadurch zu erreichen, dass der Tumor mit einem Gen versehen wird, welches das Zytokin konstitutiv exprimiert (Colombo *et al.* 1996). Mit lokalen Applikationen kann man einerseits die Effizienz der Medikamente am Tumorort erhöhen und gleichzeitig die systemischen Nebeneffekte minimieren. Mit Erfolg wurden einige Studien durchgeführt, bei denen für IL-12 kodierende DNA direkt in Melanome bei Mäusen und Pferden injiziert wurde (Heinzerling *et al.* 2002). Dabei wurden bei Versuchen an Mäusen mit humanen und murinen Melanomen sehr gute Ergebnisse erzielt. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der alle Mäuse weiteres Tumorwachstum zeigten, konnte bei der Gruppe, die mit für IL-12 kodierender Plasmid-DNA behandelt wurde, bei allen Tieren eine Tumorregression beobachtet werden. Auch in einer früheren Studie konnte die potente antitumorale Wirkung von IL-12 Plasmid-DNA gezeigt werden (Heinzerling *et al.* 2001). Hier wurde für humanes IL-12 kodierende Plasmid-DNA direkt in Melanome bei Schimmeln injiziert. Alle 12 behandelten Tumore bei 7 Schimmeln zeigten eine signifikante Regression, wobei eine Läsion innerhalb von 6 Monaten vollständig verschwand. Sowohl bei den Mäusen wie auch bei den Schimmeln traten während der ganzen Behandlungsperiode keine Nebenwirkungen auf (Heinzerling *et al.* 2001). Diese Studien unterstreichen die

Effizienz und die Sicherheit von für IL-12 kodierende Plasmid-DNA zur therapeutischen Anwendung bei malignen Melanomen im Tiermodell (Heinzerling *et al.* 2001).

3.3.7. Interleukin-18

IL-18, früher auch Interferon- γ inducing factor (IGIF) genannt, ist ein Zytokin, das 1989 erstmals beschrieben wurde (Nakamura *et al.* 1989) und von Okamura *et al.* (1995) bezüglich weiterer Eigenschaften untersucht worden ist. Es besteht aus einer Peptidkette und ist in seiner Struktur dem IL-1 sehr ähnlich. Funktionell zeigt das IL-18 starke synergistische Wirkungen zu IL-12 (Ahn *et al.* 1997; Ushio *et al.* 1996). Es regt die Proliferation von T-Lymphozyten an, fördert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und zeigt eine starke IFN- γ Produktion aus Th1-Zellen (Micallef *et al.* 1996; Okamura *et al.* 1995). IL-18 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, Kupfferschen Zellen und weiteren verwandten Zellen gebildet (Matsui *et al.* 1997; Stoll *et al.* 1998).

3.3.7.1. IL-18 und seine Antitumor-Eigenschaften

In einer Studie von Micallef *et al.* (1997) wurde der Antitumoreffekt von IL-18 an Mäusen mit intraperitonealen Sarkomen untersucht. Nach intraperitonealer bzw. intravenöser Verabreichung von IL-18 konnte ein signifikanter Tumorrückgang gemessen werden, jedoch nicht nach subkutaner Injektion. Im gleichen Versuch wurde eine Gruppe von Mäusen behandelt, deren NK-Zellaktivität durch die Verabreichung von Antikörpern aufgehoben wurde. Die Tiere, die dieser Gruppe angehörten, starben signifikant früher. Daraus schlossen die Autoren, dass die Stimulation von NK-Zellen durch IL-18 für die Tumorregression hauptverantwortlich ist. Eine weitere vielversprechende Untersuchung wurde von Nagai *et al.* (2002) durchgeführt und zeigte einen signifikanten Wachstumsrückgang von Melanomen bei Mäusen, in die für IL-18 kodierende Gene injiziert wurden. Der Antitumoreffekt blieb jedoch bei Mäusen aus, die mit Anti-IFN- γ Antikörpern vorbehandelt wurden. In histologischen Untersuchungen der behandelten Melanome konnte eine stark reduzierte Vaskularisation mit einer Nekrose gezeigt werden. In der Gruppe, die mit Antikörpern gegen IFN- γ vorbehandelt wurde, zeigten die histologischen Untersuchungen der Melanome starke Gefäßneubildungen. Diese Beobachtungen zeigen, dass das durch IL-18 induzierte IFN- γ durch seine antiangiogenetischen Eigenschaften einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorregression hat (Nagai *et al.* 2002).

3.3.7.2. Synergismus von IL-12 und IL-18

Es konnte gezeigt werden, dass IL-12 die IL-18-Rezeptoren auf T-Zellen und NK-Zellen induziert und dass diese 2 Zytokine stark synergistische Funktionen bezüglich der IFN- γ Produktion haben (Micallef *et al.* 1996; Okamura *et al.* 1995). Da IFN- γ bekannte antitumor- und antiangiogenetische Eigenschaften besitzt, war es für verschiedene Gruppen von grossem Interesse herauszufinden, ob sich der Synergismus von IL-12 und IL-18 auch in der Antitumorthherapie bestätigt. In einer klinischen Studie von Liebau *et al.* (2002a) wurden Patienten mit Osteosarkomen intratumoral mit IL-12 Plasmid-DNA behandelt. Die Transduktion der Osteosarkomzellen mit IL-12 Plasmid-DNA hatte eine starke Expression von IFN- γ aus mononukleären Zellen zur Folge, das einen antitumoralen Effekt vermittelt. Als nun in verschiedenen Gruppen zusätzlich zu den IL-12-Plasmiden rekombinantes IL-18 verabreicht wurde, konnte eine signifikante und dosisabhängige Steigerung der IFN- γ -Konzentration beobachtet werden. Das IL-18 triggert also die IL-12 vermittelte IFN- γ -Produktion und seine antitumorale Wirkung (Liebau *et al.* 2002b).

4. MATERIAL UND METHODIK

4.1. Pferde

Im Rahmen der Studie wurden 26 mit Melanomen befallene Schimmel behandelt, welche teilweise (n=20) an der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich und teilweise (n=6) an der Klinik für Chirurgie und Augenheilkunde der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorgestellt wurden. Darunter befanden sich verschiedene Pferderassen wie Lipizzaner (n=4), Schweizer Warmblut (n=3), Vollblut-Araber (n=3), Welsh Ponies (n=3), Irländer (n=2), Lusitanos (n=2), Shagya-Araber (n=2), Andalusier (n=1), Anglo-Araber (n=1), Deutsches Warmblut (n=1), Holsteiner Warmblut (n=1), Polnisches Warmblut (n=1), Württemberger Warmblut (n=1) und ein Pferd unbekannter Rasse. Die Tiere waren zwischen 3 und 27 Jahren alt (15.6 ± 5.7 Jahre). Es handelte sich um 12 Wallache, 10 Stuten und 4 Hengste.

4.2. Tumorlokalisation

Bei 22 Pferden befanden sich die Melanome an der Schweifunterseite oder in der Perinealgegend (Abb. 1 und 2). Die restlichen 4 Tiere wiesen Tumoren am Augenlid, in der Ganasche, am Bug oder im Bereich der Kruppe auf.



Abb. 1: Anfangsstadium eines Melanombefalls an der Schweifunterseite.
12-jähriger Wallach, Gruppe IL-18



Abb. 2: Fortgeschrittenes Stadium eines Melanombefalls am Schweif und perianal.
19-jähriger Hengst, Kontrollgruppe

4.3. Tiergruppen

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in 3 Gruppen eingeteilt, welche mit drei unterschiedlichen Präparaten behandelt wurden. Solitäre, gut abgegrenzte und bioptierbare Tumoren, die sich mit der Schublehre und sonographisch gut messen liessen, wurden als zur Therapie geeignete Tumoren definiert.

4.3.1. Gruppe IL-12

Die Gruppe IL-12 enthielt 8 Pferde (1 Welsh Cob Pony, 1 Shagya-Araber, 1 Anglo-Araber, 2 Irländer, 1 Deutsches Warmblut, 1 Lipizzaner, 1 Pferd unbekannter Rasse), bei denen für IL-12 kodierende Plasmid-DNA in den gewählten Tumor injiziert wurde. Darunter befanden sich 4 Wallache, 3 Stuten und 1 Hengst.

4.3.2. Gruppe IL-18

Die Gruppe IL-18 enthielt 9 Pferde (1 Polnisches Warmblut, 1 Welsh Cob Pony, 1 Irländer, 1 Holsteiner Warmblut, 1 Vollblut-Araber, 1 Württemberger Warmblut, 1 Lusitano, 2 Lipizzaner), bei denen für IL-18 kodierende Plasmid-DNA in den gewählten Tumor injiziert wurde. Darunter befanden sich 5 Wallache, 3 Stuten und 1 Hengst.

4.3.3. Gruppe Leer

Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe und setzte sich aus 9 Pferden (1 Andalusier, 1 Schweizer Warmblut, 1 Lusitano, 2 Vollblut-Araber, 1 Welsh Cob Pony, 1 Shagya-Araber, 1 Deutsches Warmblut, 1 Lipizzaner) zusammen, bei denen lediglich das Leerplasmid ohne für Interleukin kodierende Sequenzen in den Tumor injiziert wurde. Darunter befanden sich 3 Wallache, 3 Stuten und 2 Hengste.

4.4. Selektion der Tumoren und Behandlungsprotokoll

Die jeweils behandelten Tumoren (1 pro Pferd) wurden von 1 bis 26 fortlaufend nummeriert. Nummer 1-7, 22 und 26 gehörten der Gruppe Leer an, Nummer 8-13, 21 und 24 gehörten der Gruppe IL-12 an und Nummer 14-20, 23 und 25 gehörten der Gruppe IL-18 an.

Die Therapie erfolgte im Doppelblindverfahren. Das jeweils verabreichte Präparat wurde dem Patienten vor Beginn der Therapie mittels Losverfahren zugeteilt. Die Injektionslösungen wurden in neutrale Flaschen abgefüllt und mit einem Farbkode versehen. Der behandelnden Tierärztin war das verwendete Präparat nicht bekannt.

Erst nach Abschluss des Versuches wurde der Präparateschlüssel dekodiert. Für die intratumorale Injektion und die Ausmessung der Tumoren wurden die Pferde je nach Notwendigkeit individuell unterschiedlich sediert (0.5-1 mg/kg Xylazin i.v. und 0.01-0.02 mg/kg Butorphanol i.v. oder 20-80 µg/kg Detomidin i.v. und Butorphanol).

Die intratumorale Injektion wurde mit einer 22G pyrogenfreien Einwegkanüle (Terumo®, Leuven, Belgien) und einer 1-ml-pyrogenfreien Einwegspritze (Omnifix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Das entsprechende Medikament wurde höchstens eine Stunde vor Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden jeweils 250 µg Plasmid-DNA oder Leerplasmid an einer Stelle des gewählten Tumors zentral injiziert. Diese intratumorale Injektion wurde an den Tagen 1, 3 und 5 durchgeführt. Nach einem anschliessenden behandlungsfreien Intervall von einer Woche fanden wiederholte Injektionen an den Tagen 15, 17 und 19 statt.

4.5. Klinische Allgemeinuntersuchung und Blutuntersuchungen

An den Tagen 1 bis 19, sowie am Tag 64 wurde eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt, wobei der Puls, die rektale Körpertemperatur, die Atemfrequenz, die Farbe und kapilläre Füllungszeit der Schleimhäute, die Darmmotorik und das Allgemeinbefinden beurteilt wurden. Zudem wurden die behandelten Tumore täglich auf die Bildung oberflächlicher Ulzerationen oder Schwellungen im Bereich des behandelten Tumors kontrolliert. An den Tagen 1, 5, 15, 19 und 64 wurden zudem eine hämatologische-, blutchemische- und Blutgasuntersuchung durchgeführt. Aus EDTA-Blut (5 ml EDTA-Röhrchen, Sarstedt, Sevelen) wurden folgende Werte bestimmt: Erythrozyten- und Leukozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozytenindizes. Für die blutbiochemischen Untersuchungen wurde heparinisiertes Blut verwendet (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Bellerive Industrial Estate, Plymouth, UK). Die Bestimmungen umfassten die Gehalte von Bilirubin, Glukose, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein sowie die Messung der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Aspartat-Aminotransferase (AST), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ-GT), Kreatinin-Kinase (CK), Sorbit-Dehydrogenase (SDH) und Laktat-Dehydrogenase (LDH). Für die arterielle Blutentnahme wurden pyrogenfreie Einwegkanülen (Terumo®, Leuven, Belgien) und heparinisierte (Heparin Natricum, G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) Einmalspritzen (Omnifix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

verwendet. Im Weiteren wurden die Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Magnesium und Phosphat gemessen. Bei der Blutgasanalyse wurden der Blut-pH, der CO₂- und der O₂- Partialdruck, die Bikarbonat-Konzentration, der Basenexzess sowie die O₂-Sättigung gemessen. Alle Blutuntersuchungen wurden im Veterinärmedizinischen Labor der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich nach den zur Zeit gültigen Richtlinien durchgeführt.

4.6. Herstellung, Aufreinigung und Lagerung der Plasmid-DNA für das Leerplasmid, IL-12 und IL-18

Die für die Versuchsanordnung benötigte Menge an Leerplasmid, IL-12 und IL-18 Plasmid-DNA wurde unter der Leitung von Dr. Claude Schelling am Institut für Nutztierwissenschaften an der ETH Zürich hergestellt. Doppelsträngige IL-12 und IL-18 Plasmid-DNA-Konstrukte, sowie das Leerplasmid wurden der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt (Frau Dr. L. Nicolson über Intervet International, Boxmeer, Niederlanden). Es handelte sich dabei um verschiedene Konstrukte, welche nach McMonagle et al. hergestellt wurden (McMonagle et al. 2001). Mit diesen Plasmiden wurden E. Coli-Bakterien transformiert (Invitrogen Kit, Invitrogen AG, 4019 Basel). Für jedes Konstrukt wurden 30 mg Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid-Giga Kit (QIAGEN AG, Basel, Schweiz, Kategorie Nr. 12391) gemäss Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die korrekte Grösse der DNA von IL-12, IL-18 und Leerplasmid wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Die auf diese Weise bereitgestellte Plasmid-DNA wurde mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser (Aqua ad injectabilia, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) auf 500 µg/ml verdünnt und bei -70° C gelagert. Die Konstrukte für das Leerplasmid, das IL-12-Plasmid sowie das IL-18-Plasmid waren unterschiedlich.

4.7. Therapiekontrolle

Die Ausmessungen am Tag 1 vor der ersten Injektion bildeten den Basiswert. Als Kontrolle für den Behandlungserfolg wurde an den Tagen 5, 15 und 19 die Tumorgösse mittels Schublehre und sonographisch gemessen. Zusätzlich wurde die Tumovaskularisation mittels beurteilt. Eine abschliessende Kontrolle der Patienten bestehend aus klinischer und labor-diagnostischer Untersuchung sowie der Bestimmung von Grösse und Vaskularisation des Tumors wurde am Tag 64 vorgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit des Grössenverlaufs der Tumorumina

wurden diese nicht absolut in mm^3 , sondern in Prozent angegeben, wobei der Ausgangswert am Tag eins 100% entsprach.

4.7.1. Grössenkontrolle durch Schublehre

Die Grössenmessung erfolgte mittels Schublehre indem 2 Dimensionen (a, b) gemessen wurden. Auf ausgedruckten Fotos der behandelten Tumoren wurden die Messpunkte jeweils festgehalten, damit bei Kontrolluntersuchungen dieselben Strecken ausgemessen werden konnten. Das Volumen wurde mit der Formel $a^2 \times b \times 0.5$ berechnet. Bei einem Pferd der Gruppe IL-12 konnte keine Messung mit der Schublehre durchgeführt werden, da der Tumor palpatorisch schlecht abgrenzbar war und in der Tiefe lag. Es wurde also insgesamt bei 25 Pferden (IL-12: n=7; IL-18: n=9; Leer: n=9) jeweils ein Tumor ausgemessen.

4.7.2. Sonographische Untersuchung und computerisierte Bildanalyse

Zur Vorbereitung war ein Scheren der Haut selten notwendig, da die Tumoren meist an unbehaarten Stellen lagen. Zur Ankopplung wurde Ultraschallgel verwendet. Die Untersuchungen wurden mit einer 8,6-11 MHz Linearsonde durchgeführt (GE Logic 400, Pro Series, GE Medical Systems AG, Glattbrugg, Schweiz). Zuerst wurden im B-mode-Bild die Tumoren auf ihre Binnenarchitektur und Abgrenzbarkeit zur Umgebung hin untersucht. Ihre maximale Ausdehnung wurde immer in zwei Dimensionen (a, b) gemessen, um das sonographische Tumolvolumen analog dem klinischen Tumolvolumen mit der Formel $a^2 \times b \times 0.5$ zu berechnen. Für die Power Doppler-Untersuchungen wurden standardisierte, konstante Einstellungen gewählt, die auf Gefässe mit niedrigen Flussgeschwindigkeiten (maximale Bildtiefe: 4 cm; Fokus: Mitte Tumor; niedrige Bildfrequenz; grosse Pulszahl; Messbereich: 12 cm/s; niedriger Wandfilter; keine Rauschunterdrückung; keine Persistence) abgestimmt wurden. Ein rechteckiges Power Doppler-Farbfenster wurde über den Tumor gelegt, und der gesamte Tumor wurde langsam fächerartig geschallt, um einen Überblick über die Tumurvaskularisation zu erhalten. Letztlich wurden in den mittleren zwei Dritteln des Tumors 5 Power Doppler Standbilder angefertigt. Die Randbereiche des Tumors wurden dabei absichtlich ausgespart, da dort im Allgemeinen eine erhöhte, nicht repräsentative Vaskularisation zu erwarten ist. Die Bilder wurden für die computerisierte Bildanalyse in digitaler Form abgespeichert. Alle sonographischen Untersuchungen wurden von Dr. med. vet. Stefanie Ohlerth, DECVDI, Abteilung für

Bildgebende Diagnostik und Radio-Onkologie, Vetsuisse-Fakultät Zürich, durchgeführt. Die Einteilung der Patienten in die Behandlungsgruppen war der Untersucherin zum Zeitpunkt der Ultraschall-Untersuchung nicht bekannt.

Bei insgesamt 6 Pferden (jeweils 2 pro Tiergruppe) wurde keine Grössenmessung mittels Ultraschall durchgeführt. Diese Tumoren wurden lediglich mit der Schublehre gemessen. Zusätzlich zu diesen 6 Pferden konnte bei 3 Pferden (2 der IL-12-Gruppe, 1 der Kontrollgruppe) keinen Vaskularisationsverlauf gemessen werden, da die Tumoren in der Power Doppler-sonographischen Untersuchung von Anfang an keine Gefässe aufwiesen. Insgesamt wurden 15 Melanome von 15 Pferden sonographisch bezüglich ihrer Vaskularisation untersucht. Von diesen waren 6 Tiere in der Kontrollgruppe, 4 Tumore wurden mit IL-12 und 5 Tumore mit IL-18 behandelt.

Die digitalen Bilder wurden mittels einer PC-basierten Software (Qwin; Leica Microsystems AG, Glattbrugg, Schweiz) ausgewertet. Eine "region of interest (ROI)" wurde entlang der Tumorgrenzen eingezeichnet und die folgenden drei computerisierten Parameter wurden gemäss der Methode nach Fleischer *et al.* (1999) berechnet: Flächenanteil (fractional area [FA]), mittlerer Farbwert (mean color level [MCL]) und farbgewichteter Flächenanteil (color-weighted fractional area [CWFA]). Der Flächenanteil FA berechnet sich aus der Anzahl farbiger Pixel in der ROI geteilt durch die Gesamtzahl der Pixel in der ROI, multipliziert mit 100. Er repräsentiert einen Vaskularisationsindex, welcher den prozentualen Flächenanteil von Gefässen im Tumor darstellt (Messbereich 0–100%). Der Parameter MCL berechnet sich, indem die integrierten Energiewerte für Power Doppler im ROI durch die Anzahl farbiger Pixel im ROI geteilt werden. Den CWFA (Messbereich 0-100) erhält man aus der Multiplikation von FA und MCL. Beide, MCL und CFWA, erfassen die Perfusion im Tumor. MCL misst die mittlere Dichte an sich bewegenden Erythrozyten oberhalb der Grenzwert-Geschwindigkeit, wohingegen CWFA das Blutvolumen im untersuchten Gewebe bestimmt. Für jeden Parameter wurde der Mittelwert aus den 5 ausgewerteten Bildern ermittelt.

4.8. Histologische Untersuchung der Biopsien

Am Tag 1 des Behandlungsprotokolls wurde vor der Tumordinjektion eine Biopsie eines Tumors an einer anderen Stelle in der Nähe des für die Therapie ausgewählten Tumors entnommen. Am letzten Tag des Protokolls, also an Tag 64, wurde zudem der behandelte Tumor selbst biopsiert oder in toto entfernt. Dazu wurde die Stelle

aseptisch vorbereitet und lokal mit Lidokain (Lidokain Hyaluronidase 2%, G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) anästhesiert. Die Probenentnahme erfolgte je nach Tumorgrösse mit chirurgischem Besteck, einem Einweg-Stanzbiopsie-Gerät (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, Deutschland) oder einem Tru-cut-Biopsie-Schussapparat (BioptyTM, Radiplast AG, Uppsala, Schweden). Die Proben wurden in Formalinlösung (Formalinlösung 4% gepuffert pH 7, Kantonsapotheke Zürich, Schweiz) gelagert und zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet, zu 4 µm dicken Schnitten verarbeitet und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eingefärbt. Zusätzlich wurden Schnitte hergestellt, die während 40-52 Stunden in H₂O₂ gebleicht und erst anschliessend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. Nach Erfassung der Probengrössen (Trucut oder Tumor in toto) wurde von jeder Tumorgrösse festgehalten, ob folgende morphologische Kennzeichen vorhanden waren oder nicht: Ulzerationen der Epidermis über dem Tumor (sofern Epidermis in der Probe enthalten), junctionale Aktivität, Wachstumsart (sofern nicht neoplastisches Gewebe in der Probe enthalten) und die Präsenz von Mitosefiguren in neoplastischen Zellen (Präsenz von grobscholligem oder freingranulärem Pigment). Der Schweregrad von entzündlichen Infiltraten innerhalb der Neoplasie und im nicht-neoplastischen Gewebe wurde gesondert registriert und als leicht (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++) eingestuft, indem einerseits die flächenhafte Ausdehnung (weniger als 1/3, zwischen 1/3 und 1/2, mehr als 1/2) und andererseits die Stärke und Verteilung (fokal, diffus, perivaskulär) berücksichtigt wurde. Zusätzlich wurde die zelluläre Zusammensetzung evaluiert. Es wurde darauf geachtet, ob Nekrosen innerhalb der Melanome vorhanden waren und deren Ausdehnung festgehalten. Ausserdem wurde das Auftreten von apoptotischen Zellen innerhalb der Neoplasie notiert. Diese stellen sich lichtmikroskopisch als deutlich geschrumpfte Zellen mit meist hypereosinophilem Zytoplasma und kleinen, kondensierten Zellen dar. Schliesslich wurde auch die Vaskularisation (gering, mittel, stark) des Gewebes beurteilt, indem die Anzahl Gefässe innerhalb der Tumoren beurteilt wurde.

4.9. Transfektion von Melanomzellen mit pUSER-IRES-IL-12 und pUSER

Es wurden zwei verschiedene Melanomzelllinien, HoMelZh und HoMelW, bei 37° C und 5% CO₂ in RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640-Medium (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Bio Concept, Allschwil, Schweiz) und 1% Streptomycin/Antimykotikum (Life Technologies

AG, Basel, Schweiz) kultiviert. Die beiden Zelllinien wurden in je 6 Löcher einer 6-Loch-Zellkulturplatte (Becton Dickinson, Allschwil, Schweiz) überführt und in antibiotikafreiem Zellkulturmedium (RPMI-1640 mit 10% FCS) über 24 Stunden kultiviert. Zu dieser Zeit waren die Melanomzellen zu 90-95% konfluent. Es wurden jeweils 2 Löcher der beiden Platten mit pUSER-IRES-IL-12 (IL-12-Plasmid-DNA, Claude Schelling, Institut für Nutztierwissenschaften, ETH Zentrum TAN C 1, 8092 Zürich, Schweiz) und mit pUSER (Leerplasmid, Claude Schelling, Institut für Nutztierwissenschaften, ETH Zentrum TAN C 1, 8092 Zürich, Schweiz) transfiziert. Die übrigen 2 Löcher pro Platte wurden nicht transfiziert. Zur Transfektion wurde in alle Löcher das Zellkulturmedium OptiMem1 (Invitrogen, Basel, Schweiz) und Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Basel, Schweiz) zugegeben. In je zwei Löcher wurden zusätzlich 8 µl pUSER-IRES-IL-12 in einer Konzentration von 500 µl/ml bzw. 16 µl pUSER in einer Konzentration von 250 µl/ml zugesetzt. Vier Stunden nach der Zugabe von Lipofectamine 2000 wurde pro Loch 2.5 ml RPMI-Zellkulturmedium zugegeben. Nach 26 Stunden wurden die Zellen entnommen, 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand über dem Zellpellet bei -20° C eingefroren. Zur indirekten Bestimmung der biologischen Wirksamkeit des pUSER-IRES-IL-12 in vitro wurden equine periphere Blutlymphozyten (PBMC) aus Pferdeblut isoliert und in einer Zellkultur mit den Überständen aus dem oben beschriebenen Transfektionsversuch stimuliert. Nachfolgend wurde die Expression von INF- γ , dessen Synthese in PBMC durch IL-12 stimuliert wird, mittels TaqMan[®] (reverse transcriptase realtime-polymerasechainreaction) (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemessen. Die PBMC wurden nach ihrer Isolation in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und 1% Interleukin-2 (IL-2) bis zu einer Zellkonzentration von 10⁶/ml kultiviert. Es wurden je 0.5 ml des PBMC-enhaltenden Zellkulturmediums (Konzentration 10⁶/ml) in 13 Löcher einer 24-Loch-Platte gegeben. Dazu kamen in 12 Löcher je 0.5 ml der verschiedenen Überstandslösungen aus dem oben beschriebenen Transfektionsversuch. Als Positivkontrolle wurden in ein Loch 5 ng Phorbol Myristat Azetat (PMA) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) und 500 ng Ionomycin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) gegeben, wodurch die PBMC zur INF- γ -Synthese angeregt werden. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Zugabe des Überstandes und 5 Stunden nach Zugabe von PMA und Ionomycin lysiert und die RNA aus dem Zelllysate isoliert. Die Isolation wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt (Qiagen AG, Basel, Schweiz). Im Anschluss daran wurde eine quantitative real time PCR-Analyse

durchgeführt, um den Gehalt an Messenger RNA kodierend für INF- γ zu bestimmen. Die RNA wurde in einem ABI Prism 7700 TaqMan[®]-Analysegerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) amplifiziert und quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

4.10. Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Computerprogramm Systat (Systat®, 7.0 für Windows, SPSS, Zürich, Schweiz). Bei der Beurteilung der Ergebnisse wurde der Mittelwert ($\bar{x} \pm s$) für normalverteilte Werte angegeben. Der Vergleich der Tumorumfänge der 3 verschiedenen Gruppen am Tag 1 wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse durchgeführt. Um signifikante Unterschiede im Verlauf des Tumorumfanges innerhalb der Gruppen zu berechnen, wurde eine Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikanter Varianzanalyse wurde der gepaarte t-Test zum Vergleich von Einzelwerten durchgeführt. Die Assoziation zwischen dem sonographischen Tumorumfang und dem Tumorumfang gemessen mit der Schublehre wurde mit einer Korrelationsanalyse berechnet. Ergebnisse wurden bei einem P-Wert < 0.05 als signifikant erachtet.

5. ERGEBNISSE

5.1. Klinische Allgemeinuntersuchung und Blutuntersuchung

Alle 26 Pferde zeigten während der Behandlung ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Hämatologische und blutbiochemische Veränderungen traten bei keinem Pferd auf. Bei Pferden mit kleinen behandelten Tumoren (Durchmesser < 1 cm) entstand nach der Injektion jeweils eine unterschiedlich lang (1-3 Tage) andauernde, peritumoröse Schwellung. Betroffen waren davon 5 Tiere der Gruppe Leer, 3 Tiere der Gruppe IL-18 und 4 Tiere der Gruppe IL-12.

5.2. Therapiekontrolle

5.2.1. Grössenmessung der Melanome mittels Schublehre

Die mittels Schublehre bestimmten Tumorumfänge (VSL) zeigten im Verlauf der Behandlung von Tag 1 bis Tag 64 je nach Gruppe einen unterschiedlichen Verlauf des Tumorumfanges. In der Kontrollgruppe (Gruppe Leer) kam es zu keiner Volumenänderung ($P_{\text{Leer}} = 0.710$; ANOVA; Abb. 3), wohingegen es bei der Gruppe IL-12 zu einer Tendenz der Volumenabnahme kam ($P_{\text{IL-12}} = 0.089$; ANOVA; Abb. 4). Das Tumorumfang der Gruppe IL-18 zeigte einen signifikanten Rückgang ($P_{\text{IL-18}} = 0.003$; ANOVA; Abb. 5).

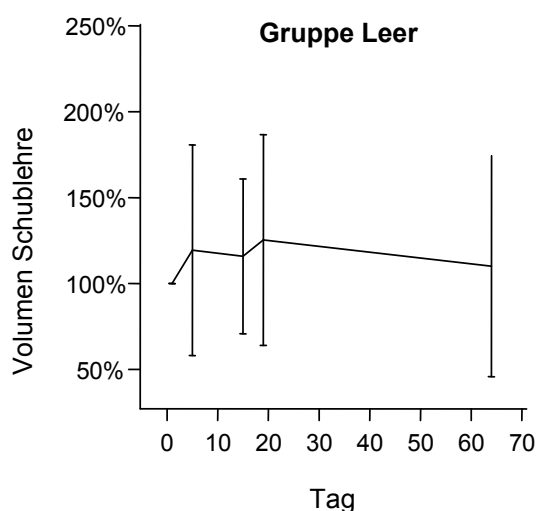


Abb. 3: Verlauf des mit der Schublehre gemessenen Tumorumfanges in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorgösse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

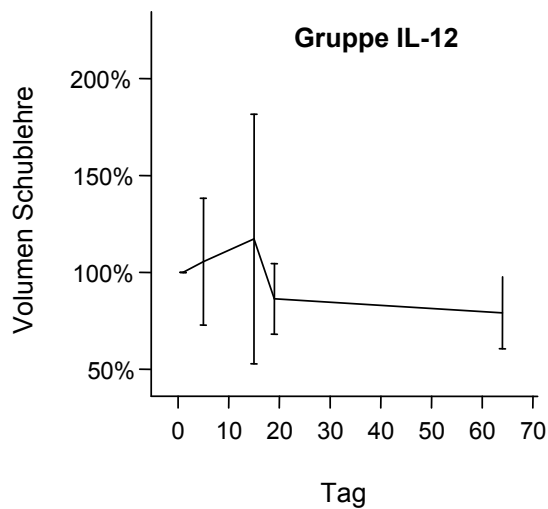


Abb. 4: Verlauf des mit der Schublehre gemessenen Tumolvolumens in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorgrosse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

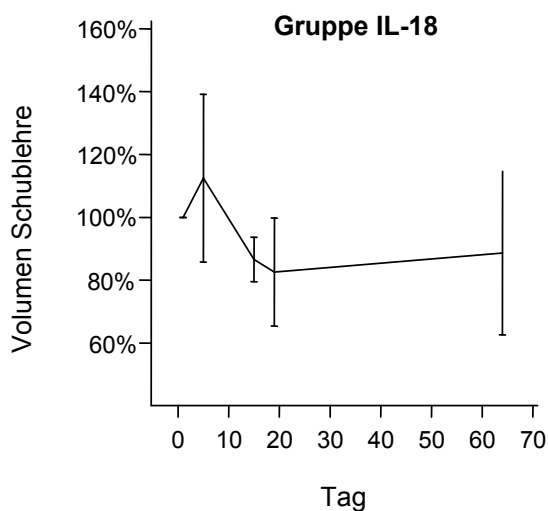


Abb. 5: Verlauf des mit der Schublehre gemessenen Tumolvolumens in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorgrosse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

Innerhalb der Kontrollgruppe (Gruppe Leer) gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich der Tumervolumina an den Messtagen 5, 15, 19 und 64 mit der Ausgangsgrösse an Tag 1. In der Gruppe IL-12 entwickelte sich eine statistisch signifikante Volumenabnahme zwischen Tag 1 und Tag 64 ($P = 0.017$; gepaarter t-

Test). Bei der Gruppe IL-18 konnte eine hochsignifikante Volumenabnahme zwischen Tag 1 und Tag 15 ($P = 0.000$; gepaarter t-Test), sowie zwischen Tag 1 und Tag 19 ($P = 0.012$; gepaarter t-Test) beobachtet werden.

5.2.2. Grössenmessung mittels Ultraschall

Die mittels Ultraschall bestimmten Tumorumfänge zeigten im Verlauf der Behandlung von Tag 1 bis Tag 64 je nach Gruppe einen unterschiedlichen Verlauf des Tumorumfanges. Jedoch war der Umrückgang weder in der Kontrollgruppe ($P = 0.347$; ANOVA; Abb. 6) noch in den Gruppen IL-12 ($P = 0.731$; ANOVA; Abb. 7) und IL-18 ($P = 0.160$; ANOVA; Abb. 8) signifikant. Das sonographische Tumorumfang und das Tumorumfang gemessen mit der Schublehre waren bezogen auf den Behandlungstag signifikant korreliert ($P < 0.0001$; Korrelationskoeffizient = $0.71-0.84$).

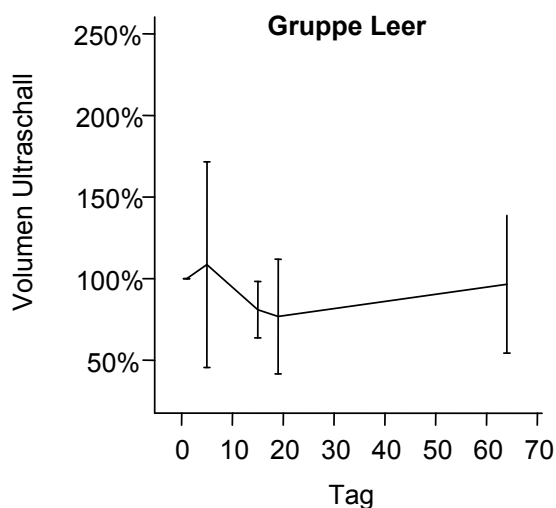


Abb. 6: Verlauf des sonographischen Tumorumfanges in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorgösse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

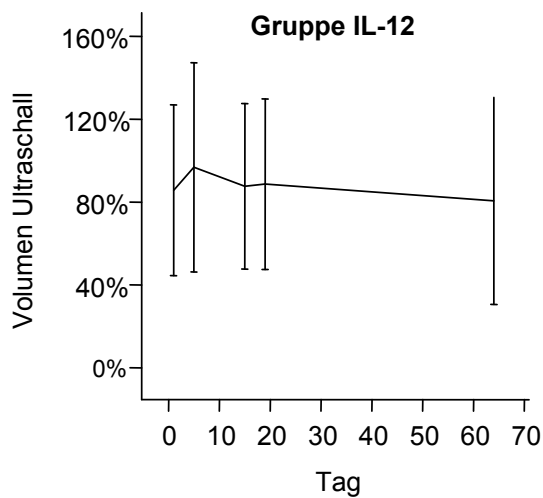


Abb. 7: Verlauf des sonographischen Tumorzvolumens in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorzgrösse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

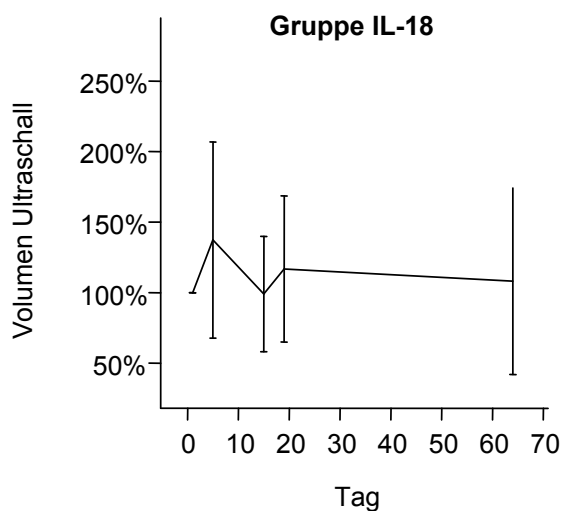


Abb. 8: Verlauf des sonographischen Tumorzvolumens in Prozent während des Untersuchungszeitraumes. Die Tumorzgrösse vor der Erstbehandlung entspricht 100%.

5.2.3. Vergleich des Tumorzvolumens der einzelnen Tiergruppen miteinander

Der Vergleich der mit der Schublehre bestimmten Tumorzvolumina der mit Leerplasmid, IL-12 respektive IL-18 behandelten Gruppen am Tag 1 (= Ausgangswert) ergab keine

signifikanten Unterschiede der Tumorgrößen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen ($P = 0.202$; ANOVA). Beim Vergleich der Größenentwicklung der Tumoren aller 3 Tiergruppen über einen Zeitraum von 64 Tagen wurden auch keine signifikanten Veränderungen festgestellt ($P = 0.191$; ANOVA).

Der Vergleich der sonographisch bestimmten Tumorumfänge der 3 Tiergruppen am Tag 1 (= Ausgangswert) ergab keine signifikanten Unterschiede der Tumorgrößen ($P = 0.339$; ANOVA). Auch der statistische Vergleich der sonographisch gemessenen Tumorumfänge der 3 Gruppen untereinander ergab über einen Zeitraum von 64 Tagen keine signifikanten Unterschiede ($P = 0.357$; ANOVA).

5.2.4. Bestimmung der Vaskularisation mit Power Doppler-Sonographie

Alle geschallten Melanome liessen sich sonographisch darstellen. Die Tumore waren von einer homogenen Textur und im Vergleich zur Subkutis leicht hypoechogen und daher gut abgrenzbar. Dies änderte sich im Laufe der Therapie bei keinem der Tumore.

Am Tag 1, 5, 15, 19 und 64 waren die Doppler-Parameter nicht signifikant verschieden für die Behandlungsgruppen. Im Allgemeinen waren sowohl die Vaskularisation (Parameter FA) und auch die Perfusion (Parameter MCL und CWFA) vor und während der gesamten Therapie niedrig.

Ein Patient der Gruppe IL-12 (Patient Nummer 10) zeigte parallel zu einem deutlichen Tumorumfangrückgang (mit Ultraschall gemessen) um 29 % über 64 Tage auch einen deutlichen Vaskularisationsrückgang. FA fiel von 1.080 auf 0.650, der CWF-Wert von 1.140 auf 0.630 und der MCL-Wert von 106.210 auf 98.930. Bei einem zweiten Patienten derselben Gruppe (Patient Nummer 12) stellte sich neben einem hochsignifikanten Tumorumfangrückgang (mit Ultraschall gemessen) um 75% parallel auch eine deutliche Minderdurchblutung des Tumors ein. Daneben trat ein Rückgang des FA-Wertes von 1.180 auf 0.290 und ein Abfall des CWF-Wertes von 1.260 auf 0.290 auf. In der Gruppe IL-18 zeigte ein Pferd (Patient Nummer 17) bei zunehmendem Tumorumfang um 35% (gemessen mit Ultraschall) über 64 Tage einen deutlichen Vaskularisationsrückgang des Tumors mit einem FA-Wert-Abfall von 4.130 auf 1.850, einem Rückgang des CWF-Wertes von 4.390 auf 1.910 und einem konstanten MCL-Wert. Ein zweites Pferd der Gruppe IL-18 (Patient Nummer 20) zeigte neben einer Tumorumfangzunahme um 20% (gemessen mit Ultraschall) über 64 Tage deutliche Vaskularisationsabnahmen im behandelten Tumor. Der FA-Wert sank hier

von 1.090 auf 0.520, der CWF-Wert von 1.050 auf 0.560 und der MCL-Wert von 103.040 auf 97.960.

5.2.5. Histologische Untersuchungen der Biopsien

5.2.5.1. Anzahl der untersuchten Biopsien

In 16 Fällen wurde sowohl eine Erst- als auch eine Zweitbiopsie (= Kontrollbiopsie am Tag 64) entnommen. In allen übrigen Fällen wurde nur eine oder keine Probe untersucht (Tab. 2). Insgesamt wurden 40 Proben untersucht, worunter sich 12 Tru-cut Biopsien befanden.

Tab. 1: Anzahl der untersuchten Biopsien.

Erst- und Kontroll-Biopsie vorhanden	Nur Erstbiopsie vorhanden	Nur Kontrollbiopsie vorhanden	Keine Biopsie vorhanden
1, 2, 5, 6, 9, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26	3	4, 8, 11, 12, 15, 17	7, 10, 19

Fünfzehn Proben enthielten ausschliesslich neoplastisches Gewebe. In 7 weiteren war nur sehr wenig nicht-neoplastisches Gewebe vorhanden. Dadurch wurde die Beurteilung der Wachstumsart erschwert und war schliesslich in 10 Proben überhaupt nicht und in 8 weiteren nur bedingt möglich. Ausserdem waren in diesen Proben keine Aussagen über durch die Therapie induzierten Veränderungen in der Umgebung des Tumors möglich. Vierzehn Proben enthielten keine Epidermis, so dass Aussagen über die Verbindung von Tumor zur Epidermis, über eine vorhandene junktionale Aktivität und über die genaue Lage des Tumors in Bezug zur Epidermis nicht möglich waren.

5.2.5.2. Histologische Befunde

Alle Prolifere wuchsen infiltrativ (soweit beurteilbar). Sie waren teilweise recht gut umschrieben, jedoch nicht bekapselt. Eine eigentliche Architektur war oft nicht erkennbar, das heisst die Tumoren zeigten ein flächenhaftes diffuses Wachstum. Gelegentlich erfolgte die Bildung von Nestern oder Bündeln. Die Mehrheit der untersuchten Tumoren (n = 26) wies einen hohen Pigmentgehalt auf. Die Zellpopulation bestand aus variablen Anteilen von grossen, rundlichen und stark

pigmentierten Zellen und kleineren, rundlichen bis plumpspindeligen, meist deutlich schwächer pigmentierten Zellen.

Zwei Tumoren waren hoch polymorph (Tumor 17, Zweitbiopsie, Tumor 20, Erstbiopsie). Drei weitere wurden als mittel- bis hochgradig polymorph eingestuft (Tumor 8, 9 und 24, jeweils Zweitbiopsie). Zehn Proben wiesen ein homogen wirkendes Proliferat geringer Polymorphie auf, alle übrigen wurden als gering- bis mittelgradig bzw. als mittelgradig polymorph beurteilt. Nur in wenigen Proben wurden vereinzelt Mitosen gesehen (Tumor 16, Erstbiopsie und Tumor 17, Zweitbiopsie). Apoptotische Zellen konnten nur in einer Probe (Tumor 20, Erstbiopsie) nachgewiesen werden. Eine deutliche Entzündung in Form von diffusen Infiltraten aus eosinophilen Zellen wurde innerhalb von Tumor 20 (Zweitbiopsie) festgestellt. Zwei weitere Proben (Tumor 9, Erstbiopsie, Tumor 16, Zweitbiopsie) enthielten einzelne Lymphozyten innerhalb des neoplastischen Gewebes. Im nicht-neoplastischen Gewebe von 5 Proben wurde eine leichtgradige, in vier weiteren eine minimale Entzündung festgestellt (Tab. 3). Nekrosen oder Gefäßthromben traten nie auf. Basierend auf den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden keine Unterschiede zwischen Erst- und Zweitbiopsien festgestellt.

Tab. 2: Vorkommen und Art der Entzündung bei verschiedenen Tumoren

Tumor	vor/nach Therapie	Grad der Entzündung	Art der Entzündung
13	nach	±	2 Gefäße (subepidermal) mit perivaskulären lymphozytären Infiltraten, wenig nicht-neoplastisches Gewebe
15	nach	±	vereinzelt Lymphozyten perivaskulär (2-3 Gefäße betroffen) in oberflächlicher Dermis, Endothelzellen der Gefäße leicht aktiviert
21	vor	±	geringe lymphozytäre Infiltrate perivaskulär, vorwiegend subepidermal
22	vor		sehr geringe, vorwiegend perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten und Neutrophilen, vor allem subepidermal
16	nach	+	perivaskulär geringe lymphozytäre Infiltrate um 3-4 Gefäße
21	nach	+	geringe lymphozytäre Infiltrate

22	nach	+	sehr geringe Infiltrate perivaskulär aus Lymphozyten, vorwiegend subepidermal
23	nach	+	sehr geringe Infiltrate aus Lymphozyten und Plasmazellen, perivaskulär und subepidermal
24	nach	+	geringe Infiltrate aus Lymphozyten, wenig nicht-neoplastisches Gewebe

5.2.6. Transfektion von Melanomzellen mit IL-12 Plasmid-DNA und Leerplasmid

In den PBMC konnte die Expression von IFN- γ mit dem Überstand aus den mit pUSER-IRES-IL-12 transfizierten Zellen stimuliert werden. Dies ist mit beiden Melanomzelllinien gelungen. Die Melanomzellen, welchen nur Lipofectamine 2000 und OptiMem1 zugesetzt wurde, konnten mit ihrem Überstand die PBMC nicht dazu stimulieren IFN- γ zu produzieren. Die Stimulation der PBMC mit den Überständen der Melanomzellen, welche mit dem leeren Plasmid pUSER transfiziert wurden, war bei der Melanomzelllinie HoMelZh nicht erfolgreich, bei einem Ansatz der Zelllinie HoMelW konnte aber eine Stimulation der IFN- γ -Synthese beobachtet werden.

6. DISKUSSION

Präklinische und klinische Studien aus der Humanmedizin zeigen erfolgversprechende Einsätze von Zytokinen als Therapeutikum gegen maligne Melanome. Obwohl in einer Arbeit von Seltenhammer (2000) gezeigt werden konnte, dass sich die Melanome beim Schimmel überaus weniger maligne verhalten als beim Menschen, besteht dennoch der Wunsch, das Wachstum dieser Knoten einzudämmen. Durch starke Wucherung entstehende sekundäre Einschränkungen wie Kot- und Harnabsatzprobleme sowie Atemwegs- oder Zäumungsprobleme könnten dadurch verhindert werden. Der Schimmel stellt ein gutes Modell zur Erarbeitung von Grundlagen zur DNA-Therapie in der Veterinärmedizin dar, was in einer Studie von Heinzerling *et al.* (2001) bereits gezeigt wurde. Der Einsatz von für die Zytokine IL-12 und IL-18 kodierender DNA anstelle von rekombinanten Interleukinen wurde in der vorliegenden Studie deshalb gewählt, weil in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass die kontinuierliche lokale Sekretion von IL-12 bzw. IL-18 im Tumor eine bessere Wirkung erzeugt als die systemisch verabreichten rekombinanten Interleukine. Der Grund dafür ist die sehr kurze Halbwertszeit der Interleukine und die entstehenden Nebenwirkungen bei der systemischen Verabreichung hoher Dosen (Nagai *et al.* 2002).

6.1. Tumoren und das Immunsystem

Viele Tumoren lassen sich nicht mittels Immunsystem bekämpfen, da sie nicht immunogen sind. Sie haben die Eigenschaft, sich den körpereigenen Abwehrmechanismen durch den Verlust von Molekülen, die für die immunologische Erkennung wichtig sind, zu entziehen (Beverley 1995). In mehreren humanmedizinischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass maligne Melanome für eine Immuntherapie gut zugänglich sind (Dietrich *et al.* 2002; Heinzerling *et al.* 2002; Heinzerling *et al.* 2001; Portielje *et al.* 2003). In diesen Studien konnte die Aktivierung des Immunsystems mittels Nachweis infiltrierter aktiver Immunzellen in und um die behandelten Tumoren nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Studie konnten bei der histologischen Untersuchung von mit IL-12 bzw. IL-18 behandelten Tumoren bei 6 von 15 Zweitbiopsien peritumoröse Infiltrate von Entzündungszellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stützt die Vermutung, dass auch Melanome beim Schimmel geeignete Tumoren zur Durchführung einer Immunotherapie darstellen.

6.1.1. Anwendung von equiner IL-12 und IL-18-Plasmid-DNA

Von Zytokinen weiss man, dass sie sehr stark speziesspezifisch sind (Gubler *et al.* 1991; Scheerlinck 1999; Schultz *et al.* 2000). So zeigten Schultz *et al.* (2000) in ihrer Studie, dass die Injektion von muriner IL-12-DNA bei Mäusen eine deutliche und langanhaltende Expression von IL-12 bewirkte. Wurde den Mäusen jedoch humane IL-12-DNA verabreicht, war die IL-12 Expression viel schwächer und kürzer. Die Autoren vermuten, dass der grosse Anteil des produzierten IL-12 via eines positiven Feedback-Mechanismus nach Stimulation von endogenen Quellen erfolgt und nur ein kleiner Teil des produzierten IL-12 direkt durch die Plasmid-DNA induziert wird. Es besteht also die Vermutung, dass nur bei Einsatz speziesspezifischer Interleukin-DNA die endogenen Mechanismen der Interleukinproduktion maximal getriggert werden (Schultz *et al.* 2000). Obwohl Zytokine für ihre hohe Speziesspezifität bekannt sind, ist es Heinzerling *et al.* (2001) gelungen, equine Melanome mit humanem IL-12 teilweise erfolgreich zu therapieren. Aufgrund dieser Erkenntnisse erhoffte man sich in der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Wirkung beim Einsatz von equinem Interleukin bei Pferden, was sich durch die positiven Resultate bestätigte. Im vorliegenden Versuch wurden die von Nicolson *et al.* (1999) sequenzierten equinen Interleukine IL-12 und IL-18 zur Therapie der Versuchspferde eingesetzt. Im Vorfeld dieser Studie wurde ein Versuch durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit der hergestellten Plasmid-DNA zu überprüfen. Die Synthese von IFN- γ aufgrund der Zugabe des Zellkulturüberstands, welcher von Melanomzellen gewonnen wurde, die mit pUSER-IRES-IL-12 transfiziert wurden, lässt darauf schliessen, dass sich in diesem Überstand ein Stimulus zur IFN- γ Synthese befindet. Es konnte somit gezeigt werden, dass mit pUSER-IRES-IL-12 *in vitro* transfizierte Melanomzellen IL-12 produzieren und sezernieren. Weiterhin ist das sezernierte IL-12 im Stande, eine biologische Wirkung im Sinne einer Induktion der IFN- γ -Synthese in Lymphozyten hervorzurufen. In drei von vier Fällen konnte mit Überstand aus mit leerem pUSER transfizierten Melanomzellen keine IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Die Synthese im vierten Fall ist möglicherweise auf eine Verunreinigung oder auf einen Fehler im Versuchsablauf zurückzuführen (unpublizierte Daten, Müller *et al.*, 2005). Somit konnte belegt werden, dass die verwendete Plasmid-DNA in der Lage ist, in transfizierten equinen Melanomzellen IFN- γ und demzufolge auch IL-12 zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals IL-18 beim Pferd eingesetzt. Der signifikante Tumervolumenrückgang bei den mit IL-18 behandelten Schimmeln bestätigt, dass der

Einsatz dieses Interleukins auch beim Pferd funktioniert. Nagai et al. (2002) haben die Wirkungsweise von IL-18 untersucht. Zusammenfassend kann man sagen, dass im Gegensatz zum IL-12 die antiangiogenetischen Fähigkeiten und nicht die in vitro nachgewiesene Induktion von T-Zellen und natürlichen Killerzellen für die Inhibition des Tumorwachstums verantwortlich sind (Okamura et al. 1995). Erstaunlicherweise konnten Nagai et al. (2000) zeigen, dass es bei Mäusen trotz einer Depletion von T- und natürlichen Killerzellen bei der Verabreichung von IL-18-DNA zu einem Tumorwachstumsstop kommt. Im Gegensatz dazu konnte für das IL-12 *in vivo* jedoch genau die Tatsache nachgewiesen werden, dass der Antitumoreffekt durch die Aktivierung der T- und natürlichen Killerzellen zustande kommt (Nagai et al. 2000). Der Hauptantitumoreffekt auf maligne Melanome ist also für IL-12 und IL-18 trotz ihrer gleichen biologischen Aktivität verschieden. Diese nachgewiesenen unterschiedlichen Wirkungsmechanismen könnten eine Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Untersuchung das IL-12 im Gegensatz zum IL-18 erst bei dem Vergleich von Tag 1 zu Tag 64 der Kontrolle einen signifikanten Rückgang des Tumorzustands zeigt, wohingegen bei den mit IL-18 behandelten Pferden der signifikante Volumenrückgang schon an Tag 15 und Tag 19 beobachtet wurde. Untersuchungen an Biopsien zeigen nämlich, dass bereits 6 Tage nach Injektion von IL-18-DNA in Melanome bei Mäusen ein deutlicher Rückgang von intratumoralen Blutgefäßen beobachtet werden kann (Nagai et al. 2002). Dies kommt einerseits durch die Upregulation antiangiogenetischer Chemokine und andererseits durch die Downregulation angiogenetischer Faktoren wie Angiogenin zustande (Nagai et al. 2002). Aufwendige Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz sind nötig, um die genaue Anzahl an Gefäßen in einer Biopsie zu evaluieren (Nagai et al. 2002). Diese Untersuchungen sind Gegenstand weiterer Studien und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Heinzerling et al. (2001) beobachteten, dass bei der Therapie von Pferdemelanomen mit humaner IL-12-DNA der deutlichste Volumenrückgang im Schnitt um Tag 30 stattfindet. Es könnte also sein, dass die Therapie mit IL-12 erst zu einem späteren Zeitpunkt die erwünschte Wirkung entfaltet als bei der Behandlung mit IL-18. Dies entspricht den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit.

6.2. Veränderungen der Tumoren unter der Therapie

6.2.1. Einflüsse auf die Tumorgrösse

Bei den Kontrollmessungen der Tumoren über das Zeitintervall von 64 Tagen konnte bei den zwei verschiedenen Messmethoden das gleiche Verhalten der Tumorumfänge beobachtet werden. Bei beiden Methoden zeigte sich bei den behandelten Tumoren ein Rückgang der Tumorgrösse. Bei der Gruppe IL-18 war das bei der Grössenmessung mit Schublehre ein signifikanter Rückgang. Bei der Ultraschall-Messmethode war der Tumorumfangrückgang bei der Gruppe IL-18 nur tendenziell signifikant. Die Volummessungen mit dem Ultraschall korrelierten jedoch bei der repeated measures analysis mit den Werten der Schublehremessung zu jedem Messzeitpunkt signifikant ($r = 0.82-0.96$). Dieser Sachverhalt lässt sich durch die kleinere Stichprobe für die Volummessung mit dem Ultraschall erklären. Weiter muss die Genauigkeit der beiden Messmethoden betrachtet werden. Eigene Erfahrungen zeigen, dass die Methode mit der Schublehre ungenauer ist als mit dem Ultraschall. Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass bei einem Teil der Patienten mit sehr kleinen Tumoren als Folge der Injektionen eine Schwellung des Tumors und des direkt umliegenden Gewebes auftrat. Es handelte sich dabei um ödematöse, nicht schmerzhaftes Schwellungen, die während 1-3 Tagen nach der Injektion beobachtet werden konnten. Da das Injektionsvolumen während des ganzen Versuches für alle Tumoren konstant gehalten wurde, konnten je nach Tumorgrösse auch injektionsbedingte Volumenzunahmen nicht verhindert werden. Mit der Schublehre wurden diese Schwellungen mitgemessen, da der Tumor teilweise nicht vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden konnte. Mit dem Ultraschall konnte jedoch sehr gut zwischen Tumor und umliegendem ödematösen Gewebe unterschieden werden. Dieses Phänomen könnte eine Erklärung für die starken Volumenveränderungen während der Behandlungsphase von Tag 1 bis Tag 19 bei den Messungen mit der Schublehre und der daraus folgenden Diskrepanz zu den Ultraschallwerten sein. Die Applikation des Medikamentes gelang bei sehr kleinen Tumoren (Durchmesser < 1 cm) nicht optimal. Da in diese kleinen Knoten im Verhältnis ein relativ grosses Volumen injiziert werden musste, kam es infolge der Druckerhöhung im Tumor unmittelbar nach der Injektion in einigen Fällen zu einem Zurückfliessen der Lösung aus der Einstichstelle. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, die Injektionsvolumina der Tumorgrösse anzupassen. Grundsätzlich wäre es in weiteren

Versuchen bezüglich der Applikation vorteilhaft, die Konzentration an DNA in der Lösung zu erhöhen, damit möglichst wenig Volumen injiziert werden muss.

6.2.2. Einflüsse auf die Tumervaskularisation

In vielen Studien am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei Behandlungen mit IL-12 und IL-18 zwar eine deutliche Tumorstadiumseinschränkung *in vivo* vorhanden war, jedoch oft kein direkter Effekt auf die Tumorzellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Nagai *et al.* 2002; Voest *et al.* 1995). Bei T-Zell-defizienten Mäusen war die Antitumoraktivität von IL-12 bzw. IL-18 nicht aufgehoben, was die Autoren schliessen liess, dass nicht nur die zelluläre Abwehr bei der Therapie eine wichtige Rolle spielt, sondern auch antiangiogenetische Eigenschaften, welche vor allem *in vivo* entfaltet werden (Nagai *et al.* 2002). Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Mechanismus dieser durch IL-12 und IL-18 induzierten Antiangiogenese (Kerbel and Hawley 1995; Sgadari *et al.* 1996; Strieter *et al.* 1995; Voest *et al.* 1995). IL-12 sowie IL-18 induzieren IFN- γ , welches wiederum die Eigenschaft besitzt, die Chemokine MIG und IP-10 zu aktivieren. Es ist noch nicht vollständig geklärt, auf welche Art diese Chemokine eine antiangiogenetische Wirkung erzeugen. Es konnte aber gezeigt werden, dass kleinste Konzentrationen von IP-10 einerseits die Chemotaxis für Endothelzellen und deren Proliferation hemmen und andererseits die Differenzierung in gefässartige Strukturen durch die Anwesenheit von IP-10 beeinflusst wird (Kerbel and Hawley 1995; Sgadari *et al.* 1996; Strieter *et al.* 1995; Voest *et al.* 1995). In einer klinischen Studie von Heinzerling *et al.* (2005) konnten in den mit IL-12-DNA behandelten Tumoren deutliche antiangiogenetische Effekte nachgewiesen werden. In immunhistologischen Untersuchungen der Biopsien der behandelten Tumoren in ihrer Studie konnte mittels Spezialfärbungen eine reduzierte Blutgefässanzahl, teilweise zerstörte Blutgefässe sowie aggregierte Erythrozyten nachgewiesen werden (Heinzerling *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser Erkenntnisse nebst der Volumenmessung auch die Vaskularisation der Tumoren bestimmt.

In der Literatur wurde an einer klinischen Studie am Beispiel des malignen Melanoms beim Hund gezeigt, dass diese Tumoren im Vergleich zu anderen Neoplasien sehr moderat durchblutet sind (Ohlerth *et al.* submitted), was in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte. Unter Berücksichtigung der Messbereiche war die Vaskularisation und Perfusion aller untersuchten Melanome von Anfang an niedrig und veränderte sich während der Therapie nicht signifikant innerhalb oder zwischen den

Therapiegruppen. Es muss jedoch einschränkend bemerkt werden, dass nur eine sehr kleine Stichprobe der Tumoren hinsichtlich ihrer Vaskularisation und Perfusion sonographisch untersucht werden konnte. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass alle behandelten Tumoren schon bei der ersten Power Doppler-Untersuchung am Tag 1 äusserst kleine Vaskularisations- und Perfusionswerte zeigten. Daher war es schwierig, den Verlauf des Vaskularisationsgrades über die 64 Tage zu beurteilen. Obwohl gezeigt wurde, dass bei einigen Tumoren eine Abnahme der Vaskularisationswerte unter der Therapie vorhanden war, darf man aufgrund dieser sehr niedrigen Zahlen die Resultate bezüglich der Therapiekontrolle nicht zu schwer gewichten. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse bezüglich des Vaskularisationsrückganges innerhalb der Therapiegruppen nicht statistisch signifikant waren. Maligne Melanome beim Schimmel lassen sich also aufgrund der sehr geringen Gefässdichte nicht optimal mittels Power Doppler-Sonographie untersuchen. Die technische Durchführung erwies sich jedoch als einfach, was auch in vorangegangenen Untersuchungen an Spontantumoren bei Hunden gezeigt werden konnte (Schärz *et al.* 2005).

6.2.3. Einflüsse auf das Tumorgewebe

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass am Ende der IL-12-Therapie histologische und immunhistologische Untersuchungen der behandelten Tumoren sehr aussagekräftig bezüglich des Wirkmechanismus und des Therapieerfolges sind (Dietrich *et al.* 2002; Gately *et al.* 1992; Heinzerling *et al.* 2005; Trinchieri 1994). Nur durch die genaue Untersuchung der Biopsien konnte jeweils auf der Zellbasis die Wirksamkeit der verabreichten Interleukine nachvollzogen werden. Tannenbaum *et al.* (1996) konnten zeigen, dass durch die bei der Verabreichung von IL-12 bzw. IL-18 induzierten Chemokine wie IP-10 und MIG (Monokine Induced by Gamma-IFN) die chemotaktische Anziehung der CD4- und CD8-Lymphozyten gesteigert wird. In der Arbeit von Heinzerling *et al.* (2005) konnten in den Biopsien der behandelten Tumoren peritumorale und tumorale Infiltrate von CD4- und CD8-Lymphozyten nachgewiesen werden. Mäuse mit der Unfähigkeit, T-Zellen zu produzieren, zeigen eine deutlich geringere Antitumoraktivität unter der Therapie mit IL-12 als immunkompetente Mäuse (Tannenbaum *et al.* 1996). Bei einer Häufung der CD4- und CD8-Zellen in den Biopsien von Tumoren, die auf die Therapie angesprochen haben, kann dies also eine Erklärung für den Erfolg sein.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten in der HE-Färbung der Biopsien intratumorale und peritumorale Infiltrate von Entzündungszellen nachgewiesen werden. In der IL-12- bzw. IL-18-Gruppe konnten jeweils bei 3 Kontrollbiopsien Infiltrate von Lymphozyten dargestellt werden, wohingegen bei der Gruppe Leer nur bei einer Kontrollbiopsie ein sehr geringes Infiltrat von Entzündungszellen festgestellt wurde. Insgesamt konnten in 6 von 15 Zweitbiopsien der mit IL-12 oder IL-18 behandelten Tumoren peritumoröse Infiltrate von Entzündungszellen nachgewiesen werden. Aus dieser Beobachtung lässt sich schliessen, dass sowohl das IL-12 wie auch das IL-18 eine positive Wirkung auf die Rekrutierung von Abwehrzellen zur Tumorbekämpfung ausüben. Eine hilfreiche Methode zur Differenzierung wäre die Immunhistologie. In mehreren Arbeiten wurde diese Methode angewendet, um CD4- und CD8-Zellen zu differenzieren (Heinzerling *et al.* 2005). Da die Biopsien der vorliegenden Studie teilweise für sehr lange Zeit in Formalin bzw. in Stickstoff gelagert wurden, war es aus technischen Gründen nicht möglich, eine Immunhistologische Untersuchung durchzuführen.

Bezüglich der Malignitätskriterien wie Wachstumsart, Anisozytose, Anisokaryose, Mitoserate, Polymorphismus sowie der Anzahl und der Grösse der Nukleolen konnten keine Unterschiede zwischen Erst- und Zweitbiopsien nachgewiesen werden. Einzig der Tumor 17 zeigte Malignitätsanzeichen wie hohe Polymorphie und vereinzelt Mitosen. Es handelte sich dabei um einen Tumor bei einem erst 3-jährigen Pferd. Bei diesem Patienten war auch die Lokalisation des Tumors untypisch. Er befand sich auf der Kruppe und metastasierte in den zugehörigen Popliteallymphknoten. Dieser Tumor wurde mit IL-18 injiziert und zeigte trotz der Behandlung eine rasche Ausdehnung des Volumens um 35 Prozent innerhalb 64 Tagen. Interessanterweise zeigte sich jedoch ein signifikanter Rückgang der Vaskularisation von einem FA Wert von 1.090 am Tag 1 auf einen Wert von 0.520 am Tag 64. Die gleichen Beobachtungen konnten auch bei Tumor 20 gemacht werden. Auch dieser Tumor zeigte mit starker Anisokaryose, Anisozytose und hoher Polymorphie Anzeichen von Malignität. Es konnte trotz Therapie mit IL-18 eine rasche Ausdehnung des Volumens um 20 Prozent gemessen werden. Auch hier konnte eine deutliche Abnahme der Vaskularisation von 4.130 am Tag 1 auf 1.850 am Tag 64 beobachtet werden. Das höhere Potential zur Malignität dieser zwei Tumoren könnte eine Erklärung für das Versagen der Therapie sein. Die starke Abnahme der Vaskularisation ist in diesem Fall wahrscheinlich auf die schnelle Ausdehnung des Tumors zurückzuführen und nicht auf antiangiogenetische Einflüsse des Medikamentes. Da die Zellen dieser zwei Tumoren durch ihr malignes Verhalten

sehr schnell wachsen, nimmt der prozentuale Anteil an Gefässen schnell ab, was diese Entwicklung des FA-Wertes erklärt. Hiermit zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die Therapie von Melanomen mit malignem Charakter sehr schwierig ist.

Die Biopsien der behandelten Tumoren wurden auch auf Nekrosen und Thrombosen innerhalb des neoplastischen Gewebes untersucht, die aber, im Gegensatz zur Arbeit von Heinzerling et al. (2002), in keiner Biopsie dargestellt werden konnten. Heinzerling et al. (2002) konnten nämlich in den behandelten Tumoren in der histologischen Untersuchung grosse Gebiete von Zelldebris mitten im Tumorgewebe darstellen. Nekrosen durch Hypoxie oder durch Apoptose könnten die Ursache für den Zelltod sein. Andere Autoren berichten zudem über eine starke Makrophageneinwanderung in Tumoren nach Behandlung mit IL-12 (Ha *et al.* 1998; Tannenbaum *et al.* 1996), was jedoch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Proben nicht der Fall war. In der vorliegenden Studie war es aufgrund der Tumorgrösse nicht immer möglich, den ganzen Tumor zu entfernen und histologisch anzuschauen. Bei mehreren Pferden aus allen Gruppen konnten teilweise im Verhältnis zum behandelten Tumor nur sehr kleine Ausschnitte betrachtet werden. Es könnte also sein, dass Tumororte, an denen immunologische Aktivität vorhanden war, nicht biopsiert wurden. Nagai et al. (2002) konnten zeigen, dass sich die induzierten Entzündungszellen, die das antiangiogenetisch sehr wirksame IFN- γ sezernieren, vorwiegend peritumorös ansammeln. Teilweise wurden aber in der vorliegenden Arbeit sehr kleine Tru-cut Biopsien aus dem Zentrum des Tumors entnommen. Somit konnte man die Peripherie des Tumors histologisch nicht untersuchen, was ein Grund für die eingeschränkten histologischen Befunde einzelner Biopsien sein könnte.

6.3. Nebenwirkungen

Über schwerwiegende Nebenwirkungen der Interleukine wird in der Literatur oft berichtet. Auch tödliche Nebenwirkungen beim Einsatz von rekombinantem IL-12 bzw. IL-18 beim Menschen werden beschrieben (Cohen 1995; Leonard *et al.* 1997). Die häufigsten Nebenwirkungen, die aus den humanmedizinischen Studien beim Einsatz von IL-12 beschrieben werden, sind Gewichtsverlust, Fieber, Kopfschmerzen, Nausea, Lethargie, Atemwegsprobleme, Splenomegalie, Schleimhautentzündungen, Anämie, Leukopenie, Hypoproteinämie und Abfall der Elektrolyte (Atkins *et al.* 1997; Golab and Zagodzón 1999). Gately et al. (1994) stellten fest, dass bei einem Einsatz von IL-12 die Nebenwirkungen erst bei einer 500-fach höheren Dosierung auftreten, als für eine

positive immunregulatorische Aktivität benötigt wird. Aufgrund der hohen Toxizität bei einem systemischen Einsatz von rekombinantem IL-12 wurde die Methode der lokalen Injektion von für IL-12 kodierender DNA entwickelt. Dabei wurden einerseits viel geringere Nebenwirkungen beobachtet und andererseits, im Vergleich zum Einsatz von rekombinantem IL-12, eine gesteigerte antitumorale Wirkung erzielt (Rakhmilevich *et al.* 1997; Rakhmilevich *et al.* 1999; Schultz *et al.* 1999). Das geringe Auftreten toxischer Nebenwirkungen konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Der Allgemeinzustand sämtlicher Pferde war unter der Behandlung unverändert, und die Blutwerte lagen bei allen Tieren im Normalbereich.

6.4. Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geht hervor, dass die intratumorale Injektion von IL-18-DNA und teilweise auch IL-12-DNA einen während der Untersuchungszeit hemmenden Effekt auf das Melanomwachstum beim Schimmel hat. Die erreichten Ergebnisse sind sicher noch nicht zufriedenstellend. Sie repräsentieren aber einen guten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Gegenstand weiterer Untersuchungen wäre sicher eine Langzeitstudie, denn das Ziel ist, nicht nur eine kurzfristige Einschränkung des Tumorwachstums, sondern eine langfristige Tumorstase oder sogar eine Tumorregression zu erreichen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn, H.J., Maruo, S., Tomura, M., Mu, J., Hamaoka, T., Nakanishi, K., Clark, S., Kurimoto, M., Okamura, H. and Fujiwara, H. (1997) A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* **159**, 2125-2131.
- Akira, S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: Lessons from knockout mice. *Stem Cells* **17**, 138-146.
- Atkins, M.B., Robertson, M.J., Gordon, M., Lotze, M.T., DeCoste, M., DuBois, J.S., Ritz, J., Sandler, A.B., Edington, H.D., Garzone, P.D., Mier, J.W., Canning, C.M., Battiato, L., Tahara, H. and Sherman, M.L. (1997) Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **3**, 409-417.
- Bajetta, E., Del Vecchio, M. and Mortarini, R. (1998) Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **4**, 75-85.
- Beissert, M., Delorme, S., Mutze, S., Lees, W.R., Bahner, M.L., Filimonow, S., Gillams, A.R., Zuna, I., Bauer, A. and Jenett, M. (2002) Comparison of B-mode and conventional Colour/Power Doppler ultrasound, contrast-enhanced Doppler ultrasound and spiral CT in the diagnosis of focal lesions of the liver: Results of a multicentre study. *Ultraschall Med* **23**, 245-250.
- Beverley, P. (1995) Tumorimmunologie. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3 edn., Eds: I.M. Roitt, J. Brostoff, Thieme Verlag, Stuttgart. pp 246-257.
- Borgstrom, S., von Eyben, F.E., Flodgren, P., Axelsson, B. and Sjogren, H.O. (1982) Human leukocyte interferon and cimetidine for metastatic melanoma. *N Engl J Med* **307**, 1080-1081.
- Brunda, M.J., Luistro, L., Rumennik, L., Wright, R.B., Dvoroziak, M., Aglione, A., Wigginton, J.M., Wiltout, R.H., Hendrzak, J.A. and Palleroni, A.V. (1996) Antitumor activity of interleukin 12 in preclinical models. *Cancer Chemoth Pharm* **38**, S16-S21.
- Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F. and Gately, M.K. (1993) Antitumor and Antimetastatic Activity of Interleukin-12 against Murine Tumors. *J Exp Med* **178**, 1223-1230.
- Bukowski, R. and Tannenbaum, C.S. (2002) Interleukin-12: Immunologic and Antitumor Effects in Human Malignant Melanoma. In: *Melanoma: Biologically Targeted Therapeutics*, 1 edn., Ed: E.C. Borden, Humana Press, Totowa. pp 221-234.
- Bukowski, R.M., Rayman, P., Molto, L., Tannenbaum, C.S., Olencki, T., Peereboom, D., Tubbs, R., McLain, D., Budd, G.T., Griffin, T., Novick, A., Hamilton, T.A. and Finke, J. (1999) Interferon-gamma and CXC chemokine induction by interleukin 12 in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **5**, 2780-2789.

- Burnet, F.M. (1970) Concept of Immunological Surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1-9.
- Büttner, M., Wanke, R. and Obermann, B. (1991) Natural killer (NK) activity of porcine blood lymphocytes against allogeneic melanoma target cells. *Immunopathology* **29**, 89-103.
- Cohen, J. (1995) Clinical-Trials - Il-12 Deaths - Explanation and a Puzzle. *Science* **270**, 908-908.
- Colombo, M.P. and Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth F R* **13**, 155-168.
- Colombo, M.P., Vagliani, M., Spreafico, F., Parenza, M., Chiodoni, C., Melani, C. and Stoppacciaro, A. (1996) Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression. *Cancer Res* **56**, 2531-2534.
- Cosgrove, D. (1999) The breast. *European Radiology* **9**, S401-S402.
- Dahme, E. and Weiss, E. (1999) Tumoren der Pigmentzellen. In: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, 5 edn., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart pp 541-546.
- Daniel, S.L., Ogilvie, G.K. and Felsburg, P.J. (1990) Modulation of canine lymphocyte blastogenesis via histamine. *Vet Immunol Immunopathol* **24**, 69-77.
- Denis, F., Bougnoux, P., Paon, L., le Floch, O. and Tranquart, F. (2003) Radiosensitivity of rat mammary tumors correlates with early vessel changes assessed by power Doppler sonography. *J Ultrasound Med* **22**, 921-929.
- Dietrich, A., Kraus, K., Brinckmann, U., Friedrich, T., Müller, A., Liebert, U.G. and Schönfelder, M. (2002) Complex cancer gene therapy in mice melanoma. *Langenbeck Arch Surg* **387**, 177-182.
- Elgert, K.D., Alleva, D.G. and Mullins, D.W. (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* **64**, 275-290.
- Fingar, V.H., Wieman, T.J., Wiehle, S.A. and Cerrito, P.B. (1992) The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res* **52**, 4914-4921.
- Fleischer, A.C., Wojcicki, W.E., Donnelly, E.F., Pickens, D.R., Thirsk, G., Thurman, G.B. and Hellerqvist, C.G. (1999) Quantified color Doppler sonography of tumor vascularity in an animal model. *J Ultras Med* **18**, 547-551.
- Foley, G.L., Valentine, B.A. and Kincaid, A.L. (1991) Congenital and Acquired Melanocytomas (Benign Melanomas) in 18 Young Horses. *Vet Pathol* **28**, 363-369.

- Folkman, J. (1995) Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* **333**, 1757-1763.
- Freeman, D.E. (1992) Rectum and Anus. In: *Equine Surgery*, 2 edn., Eds: J.A. Auer and J.A. Stick, W. B. Saunders Company, Philadelphia. p 287.
- Gallagher, R.P., Elwood, J.M., Threlfall, W.J., Spinelli, J.J., Fincham, S. and Hill, G.B. (1987) Socioeconomic status, sunlight exposure, and risk of malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst* **79**, 647-652.
- Gately, M.K., Gubler, U., Brunda, M.J. and Nadeau, R. (1994) Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases. *Ther Immunol* **1**, 187-196.
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U. and Presky, D.H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology* **16**, 495-521.
- Gately, M.K., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M. and Chizzonite, R. (1992) Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* **143**, 127-142.
- Gebhart, W. and Niebauer, G. (1977) Connections between Pigment Loss and Melanomatosis in Gray Horses of Lipizzaner Breed. *Yale J Biol Med* **50**, 558-559.
- Gee, M.S., H.M., S., Lee, J., J.F., S. and Jenkins, W.T. (2001) Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res* **61**, 2974-2982.
- Gee, M.S., Koch, C.J., Evans, S.M., Jenkins, W.T., Pletcher, C.H., Moore, J.S., Koblisch, H.K., Lee, J., Lord, E.M., Trinchieri, G. and Lee, W.M.F. (1999) Hypoxia-mediated apoptosis from angiogenesis inhibition underlies tumor control by recombinant interleukin 12. *Cancer Res* **59**, 4882-4889.
- Goetz, T.E. and Long, M.T. (1993) Treatment of Melanomas in Horses. *Comp Cont Educ Pract* **15**, 608-610.
- Golab, J. and Zagozdzon, R. (1999) Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies (Review). *Int J Mol Med* **3**, 537-544.
- Goldschmidt, M.H. and Hendrick, M.J. (2002) Melanocytic tumours. In: *Tumours in domestic animals*, 4 edn., Ed: D.J. Meuten, Iowa Atate Press, Iowa. pp 78-84.
- Gorham, S. and Robl, M. (1986) Melanoma in the Gray Horse - the Darker Side of Equine Aging. *Vet Med-Us* **81**, 446-&.

- Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C. and et al. (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4143-4147.
- Ha, S.J., Lee, S.B., Kim, C.M., Shin, H.S. and Sung, Y.C. (1998) Rapid recruitment of macrophages in interleukin-12-mediated tumour regression. *Immunology* **95**, 156-163.
- Heinzerling, L., Burg, G., Dummer, R., Maier, T., Oberholzer, P.A., Schultz, J., Elzaouk, L., Pavlovic, J. and Moelling, K. (2005) Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: Clinical efficacy. *Human Gene Therapy* **16**, 35-48.
- Heinzerling, L., Dummer, R., Pavlovic, J., Schultz, J., Burg, G. and Moelling, K. (2002) Tumor regression of human and murine melanoma after intratumoral injection of IL-12-encoding plasmid DNA in mice. *Exp Dermatol* **11**, 232-240.
- Heinzerling, L., Feige, K., Rieder, S., Akens, M., Dummer, R., Stranzinger, G. and Moelling, K. (2001) Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. *J Mol Med* **117**, 539-539.
- Hlatky, L., Hahnenfeldt, J. and Folkman, J. (2002) Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J National Cancer Institute* **94**, 883-893.
- Janeway, C.A. and Travers, P. (1997) Der Einsatz der Immunreaktion zur Tumorbekämpfung. In: *Immunologie*, 2 edn., Eds: C.A. Janeway and P. Travers, Spektrum akademischer Verlag GmbH, Berlin. pp 514-523.
- Jeglum, K.A. (1999) Melanomas. In: *Current Therapy in Equine Medicine* 4, Ed: N.E. Robinson, W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp 399-400.
- Jungi, T.W. (2000) Neoplasie und Immunität. In: *Klinische Veterinärimmunologie*, Ed: T.W. Jungi, Enke Verlag GmbH, Stuttgart. pp 3-33.
- Keilholz, U., Conradt, C., Legha, S.S., Khayat, D., Scheibenbogen, C., Thatcher, N., Goey, S.H., Gore, M., Dorval, T., Hancock, B., Punt, C.J.A., Dummer, R., Avril, M.F., Bocker, E.B., Benhammouda, A., Eggermont, A.M.M. and Pritsch, M. (1998) Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: A case record-based analysis of 631 patients. *J Clin Oncol* **16**, 2921-2929.
- Kerbel, R.S. and Hawley, R.G. (1995) Interleukin-12 - Newest Member of the Antiangiogenesis Club. *J Natl Cancer I* **87**, 557-559.
- Leonard, J.P., Sherman, M.L., Fisher, G.L., Buchanan, L.J., Larsen, G., Atkins, M.B., Sosman, J.A., Dutcher, J.P., Vogelzang, N.J. and Ryan, J.L. (1997) Effects of

- single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* **90**, 2541-2548.
- Liebau, C., Baltzer, A.W.A., Schmidt, S., Roesel, C., Karreman, C., Prisack, J.B., Bojar, H. and Merk, H. (2002a) Interleukin-12 and interleukin-18 induce indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in human osteosarcoma cell lines independently from interferon-gamma. *Anticancer Res* **22**, 931-936.
- Liebau, C., Merk, H., Roesel, C., Schmidt, S., Karreman, C., Prisack, J.B., Bojar, H. and Baltzer, A.W. (2002b) rIL-18 triggered gene therapy based on a transduction with the IL-12 plasmid: a new option as immuno-therapy for osteosarcoma? *Anticancer Res* **22**, 2559-2565.
- Luster, A.D., Greenberg, S.M. and Leder, P. (1995) The Ip-10 Chemokine Binds to a Specific Cell-Surface Heparan-Sulfate Site Shared with Platelet Factor-4 and Inhibits Endothelial-Cell Proliferation. *J Exp Med* **182**, 219-231.
- M'Fadyean, J. (1933) Equine Melanomatosis. *J Comp Path* **46**, 186-204.
- Matsui, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Hyodo, Y., Hayashi, N., Hiroishi, K., Kawada, N., Okamura, H., Nakanishi, K. and Higashino, K. (1997) Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4(+) NK1.1(+) T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol* **159**, 97-106.
- May, S.A. (1989) *Mediators of Equine Joint Disease*. PhD Thesis, University of London, London.
- McMonagle, E.L.J., Taylor, S., Van Zuilekom, H., Sanders, L., Scholtes, N., Keanie, J.L., Hopkins, N.A., Logan, N.A., Bain, D., Argyle, D.J., Onions, D.E., Schijns, V.E. and Nicolson, L. (2001) Production of biologically active equine interleukin 12 through expression of p35, p40 and single chain IL-12 in mammalian and baculovirus expression systems. *Equine Veterinary Journal* **33**, 693-698.
- Micallef, M.J., Ohtsuki, T., Kohno, K., Tanabe, F., Ushio, S., Namba, M., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fuji, M., Ikeda, M., Fukuda, S. and Kurimoto, M. (1996) Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: Synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* **26**, 1647-1651.
- Micallef, M.J., Yoshida, K., Kawai, S., Hanaya, T., Kohno, K., Arai, S., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fujii, M., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (1997) In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol Immun* **43**, 361-367.
- Morris, E.A. and Treadwell, B.V. (1994) Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* **55**, 138-146.

- Motzer, R.J., Rakhit, A., Schwartz, L.H., Olencki, T., Malone, T.M., Sandstrom, K., Nadeau, R., Parmar, H. and Bukowski, R. (1998) Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **4**, 1183-1191.
- Nagai, H., Hara, I., Horikawa, T., Fujii, M., Kurimoto, M., Kamidono, S. and Ichihashi, M. (2000) Antitumor effects on mouse melanoma elicited by local secretion of interleukin-12 and their enhancement by treatment with interleukin-18. *Cancer Invest* **18**, 206-213.
- Nagai, H., Hara, I., Horikawa, T., Oka, M., Kamidono, S. and Ichihashi, M. (2002) Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation. *J Invest Dermatol* **119**, 541-548.
- Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K. and Tamura, T. (1989) Endotoxin-Induced Serum Factor That Stimulates Gamma Interferon-Production. *Infect Immun* **57**, 590-595.
- Nastala, C.L., Edington, H.D., Mckinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J., Gately, M.K., Wolf, S.F., Schreiber, R.D., Storkus, W.J. and Lotze, M.T. (1994) Recombinant IL-12 Administration Induces Tumor-Regression in Association with Ifn-Gamma Production. *J Immunol* **153**, 1697-1706.
- Nicolson, L., Penha-Goncalves, M.N., Keanie, J.L., Logan, N.A., Argyle, D.J. and Onions, D.E. (1999) Cloning and sequencing of horse interleukin-12 and interleukin-18 cDNAs. *Immunogenetics* **50**, 94-97.
- Ohlerth, S., Lalahova, D., Wergin, M., Melzer, K., Hauser, B., Roos, M. and Kaser-Hotz, B. (submitted) Vascularity and perfusion differs significantly in canine tumours: assessment with quantified contrast-enhanced power Doppler ultrasonography.
- Ohmuro, K., Okada, K., Satoh, A., Murakami, K., Satake, S., Asahina, M., Numakunai, S. and Ohshima, K. (1993) Morphogenesis of Compound Melanosomes in Melanoma-Cells of a Gray Horse. *J Vet Med Sci* **55**, 677-680.
- Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M. (1995) Cloning of a New Cytokine That Induces Ifn-Gamma Production by T-Cells. *Nature* **378**, 88-91.
- Osaki, T., Péron, J.M., Cai, Q. and Okamura, H. (1998) INF-gamma-Inducing Factor/IL-18 Administration Mediates INF-gamma- and IL-12-Independent Antitumor Effects. *The Journal of Immunology* **160**, 1742-1749.
- Portielje, J.E.A., Gratama, J.W., van Ojik, H.H., Stoter, G. and Kruit, W.H.J. (2003) IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol Immun* **52**, 133-144.

- Pulley, L.T. and Stannard, A.A. (1990) Tumors of the skin and soft tissues. In: *Tumors in Domestic Animals*, 3 edn., Ed: J.E. Moulton, University of California Press, Berkeley. pp 75-82.
- Rakhmievich, A.L., Janssen, K., Turner, J., Culp, J. and Yang, N.S. (1997) Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior antitumor activity of interleukin-12. *Hum Gene Ther* **8**, 1303-1311.
- Rakhmievich, A.L., Timmins, J.G., Janssen, K., Pohlmann, E.L., Sheehy, M.J. and Yang, N.S. (1999) Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: a direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *J Immunother* **22**, 135-144.
- Rieder, S., Stricker, C., Joerg, H., Dummer, R. and Stranzinger, G. (2000) A comparative genetic approach for the investigation of aging grey horse melanoma. *J Anim Breed Genet* **117**, 73-82.
- Roels, S., Tilmant, K., Van Daele, A., Van Marck, E. and Ducatelle, R. (2000) Proliferation, DNA ploidy, p53 overexpression and nuclear DNA fragmentation in six equine melanocytic tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **47**, 439-448.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Aebersold, P.M., Linehan, W.M., Seipp, C.A. and White, D.E. (1989) Experience with the Use of High-Dose Interleukin-2 in the Treatment of 652 Cancer-Patients. *Ann Surg* **210**, 474-485.
- Rowe, E.L. and Sullins, K.E. (2004) Excision as treatment of dermal melanomatosis in horses: 11 cases (1994-2000). *J Am Vet Med Assoc* **225**, 94-96.
- Schärz, M., Ohlerth, S. and Achermann, R. (2005) Evaluation of quantified contrast-enhanced color and power Doppler ultrasonography for the assessment of vascularity and perfusion of naturally occurring tumors in dogs. *Am J Vet Res* **66**, 21-29.
- Scheerlinck, J.P. (1999) Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Vet Immunol Immunopathol* **72**, 39-44.
- Schiefer, D., Gottstein, C., Diehl, V. and Engert, A. (1999) Anti-angiogenesis: a new approach to tumor therapy? *Med Klin (Munich)* **94**, 570-579.
- Schroeder, R., Bostanjoglo, M. and Rademaker, J. (2003) Role of power Doppler techniques and ultrasound contrast enhancement in the differential diagnosis of focal breast lesions. *Eur Radiol* **13**, 68-79.
- Schultz, J., Heinzerling, L., Pavlovic, J. and Moelling, K. (2000) Induction of long-lasting cytokine effect by injection of IL-12 encoding plasmid DNA. *Cancer Gene Ther* **7**, 1557-1565.

- Schultz, J., Pavlovic, J., Strack, B., Nawrath, M. and Moelling, K. (1999) Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA. *Hum Gene Ther* **10**, 407-417.
- Scott, D.W. and Miller, W.J. (2003) Melanocytic neoplasm. In: *Equine Dermatology*, 1 edn., Eds: D.W. Scott and W.J. Miller, Saunders, St. Louis. pp 764-773.
- Searle, A.G. (1968) *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals*, Logos Press, London.
- Seltenhammer, M. (2000) *Vergleichende Untersuchungen zum equinen und humanen Melanom*, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria.
- Sgadari, C., Angiolillo, A.L., Cherney, B.W., Pike, S.E., Farber, J.M., Koniaris, L.G., Vanguri, P., Burd, P.R., Sheikh, N., Gupta, G., TeruyaFeldstein, J. and Tosato, G. (1996) Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *P Natl Acad Sci USA* **93**, 13791-13796.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y.T., Street, S.E.A., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y. and Godfrey, D.I. (2000) Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* **191**, 661-668.
- Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J. and Enk, A.H. (1998) Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* **28**, 3231-3239.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D. and Polverini, P.J. (1995) Interferon-Gamma-Inducible Protein-10 (Ip-10), a Member of the C-X-C Chemokine Family, Is an Inhibitor of Angiogenesis. *Biochem Bioph Res Co* **210**, 51-57.
- Sundberg, J.P., Burnstein, T., Page, E.H., Kirkham, W.W. and Robinson, F.R. (1977) Neoplasms of Equidae. *J Am Vet Med Assoc* **170**, 150-152.
- Tahara, H., Lotze, M., Robbins, P.D., Storkus, W.J. and Zitvogel, L. (1995) IL-12 gene therapy using direct injection of tumors with genetically engineered autologous fibroblasts. *Hum Gene Ther* **6**, 1607-1624.
- Talukdar, A.H. (1973) A Histological Study of the Dermo-epidermal Junction of the Skin of Horse. *Res Vet Sci* **15**, 328-332.
- Tannenbaum, C.S., Wicker, N., Armstrong, D., Tubbs, R., Finke, J., Bukowski, R.M. and Hamilton, T.A. (1996) Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J Immunol* **156**, 693-699.
- Theon, A.P., Pascoe, J.R., Carlson, G.P. and Krag, D.N. (1993) Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses. *J Am Vet Med Assoc* **202**, 261-267.

- Tizard, I.R. (2000) Resistance to Tumors. In: *Veterinary Immunology: an introduction*, Ed: I.R. Tizard, WB Saunders Company, Philadelphia. pp 295-306.
- Trinchieri, G. (1994) Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* **84**, 4008-4027.
- Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev of Immunol* **13**, 251-276.
- Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Micallef, M., Fujii, M., Torigoe, K., Tanimoto, T., Fukuda, S., Ikeda, M., Okamura, H. and Kurimoto, M. (1996) Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-Inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* **156**, 4274-4279.
- Valentine, B.A. (1995) Equine Melanocytic Tumors - a Retrospective Study of 53 Horses (1988 to 1991). *J Vet Intern Med* **9**, 291-297.
- Voest, E.E., Kenyon, B.B., Oreilly, M.S., Truitt, G., Damato, R.J. and Folkman, J. (1995) Inhibition of Angiogenesis in-Vivo by Interleukin-12. *J Natl Cancer I* **87**, 581-586.
- Vogelnest, L. and Müller, R. (1993) Dermatology. In: *Manual of equine practice*, 2 edn., Eds: R.J. Rose and D.R. Hodgson, W. B. Saunders, Philadelphia. p 498.
- Wachsberger, P., Burd, R. and Dicker, A.P. (2003) Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: Exploring mechanisms of interaction. *Clin Cancer Res* **9**, 1957-1971.
- Weidner, N. (1995) Current Pathological Methods for Measuring Intratumoral Microvessel Density within Breast-Carcinoma and Other Solid Tumors. *Breast Cancer Res Tr* **36**, 169-180.
- William, C., Maurer, J. and Schroeder, R. (1998) Assessment of vascularity in reactive lymph nodes by means of D-galactose contrast-enhanced Doppler sonography. *Invest Radiol* **33**, 146-152.
- Yamamoto, K., Shibata, F., Miura, O., Kamiyama, R., Hirosawa, S. and Miyasaka, N. (1999) Physical interaction between interleukin-12 receptor beta 2 subunit and Jak2 tyrosine kinase: Jak2 associates with cytoplasmic membrane-proximal region of interleukin-12 receptor beta 2 via amino-terminus. *Biochem Bioph Res Co* **257**, 400-404.

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. K. Feige für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates und die freundliche und geduldige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Felix Ehrensperger vom Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. Claude Schelling und Frau B. Pineroli vom Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich für die Herstellung der Plasmid-DNA.

Frau Dr. med. vet. Stefanie Ohlerth und Frau Dr. med. vet. Dasha Luluha von der Abteilung Bildgebende Diagnostik und Radio-Onkologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich für die Ultraschalluntersuchungen.

Frau Dr. med. vet. Paula Grest vom Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich für die Untersuchungen der Tumorbiopsien.

Herrn Prof. Dr. H. Lutz und dem Personal des Veterinärmedizinischen Labors der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich für die Ausführung der Blutuntersuchungen.

Matthias für die Geduld und Hilfe bei den computertechnischen Problemen und seiner moralischen Unterstützung.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. med. vet. F. Drouard, Dr. med. vet. M. Wehrli, Dr. med. vet. T. Schweizer, N. Metzger, J. Müller, S. Germann, sowie den Pflegern für die Mithilfe und Betreuung der Pferde und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meiner Familie, meinen Freunden und den vielen ungenannten Helfern für die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

9. LEBENSLAUF

Name Patrizia Stähli
Geburtsdatum 27. Dezember 1976
Geburtsort Basel
Nationalität Schweizerin
Heimatort Zürich

1983-1988 Primarschule in Gipf-Oberfrick, AG

1988-1992 Bezirksschule in Frick, AG

1992-1996 Neue Kantonsschule Aarau, AG

1996 Eidgenössische Maturität Typus D (neusprachlich)

1996-2002 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich

2002 Staatsexamen

2003-2005 Assistentin in der Abteilung der Pferdemedizin, Pferdeklunik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

